

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів  
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ВПЛИВ N-(ФОСФОНОМЕТИЛ)ГЛІЦИНУ НА РОЗВИТОК  
*RHODOTORULA SPP.*  
ЗА УМОВ КОРОТКО- ТА ДОВГОТРИВАЛОЇ ДІЇ**

**Кваліфікаційна робота  
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)**

***Виконала:***

студентка 4 курсу, 407 групи  
Спеціальності 162 «Біотехнології  
та біоінженерія»

**Тихенька Аннаріна**

**Володимирівна**

***Керівник:***

кандидат біологічних наук, доцент

**Васіна Л.М.**

*До захисту допущено*

*на засіданні кафедри біохімії та біотехнології*

*протокол № \_\_\_\_ від \_\_\_\_\_ 2025 р.*

*Зав. кафедрою \_\_\_\_\_ доцент Волощук О.М.*

## АНОТАЦІЯ

*У роботі досліджували вплив гербіциду N-(фосфонометил)гліцину на фізіолого-біохімічні показники двох видів дріжджів: Rhodotorula rubra та Rhodotorula minuta. У ході роботи визначено зміну ростових характеристик за коротко- та довготривалого впливу гербіциду, кількості колонієутворюючих одиниць, вміст фосфору неорганічного, екзополісахаридів, каротиноїдів, рівня тіобарбітурат-активних речовин.*

**Ключові слова:** *N-(фосфонометил)гліцин, Rhodotorula spp., фунгітоксичність, дозозалежність.*

*The study investigated the effect of the herbicide N-(phosphonomethyl)glycine on the physiological and biochemical parameters of two yeast species: Rhodotorula rubra and Rhodotorula minuta. During the research, changes in growth characteristics under short-term and long-term exposure to herbicide were assessed, as well as colony-forming unit (CFU) counts, inorganic phosphorus content, exopolysaccharide levels, carotenoid accumulation, and the concentration of thiobarbituric acid reactive substances.*

**Keywords:** *N-(phosphonomethyl)glycine, Rhodotorula spp., fungitoxicity, dose-dependence.*

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	<b>5</b>
<b>1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	<b>7</b>
1.1. Характеристика N-(фосфонометил)гліцину.....	7
1.2. Шляхи перетворення та біодеградації N-фосфонометилгліцину..	9
1.3. Дріжджі роду <i>Rhodotorula</i> та їхня роль в утилізації шкідливих продуктів.....	11
<b>2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	<b>18</b>
2.1. Матеріали дослідження.....	18
2.2. Схема дослідження.....	18
2.3. Методи дослідження.....	20
<b>3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ</b> .....	<b>25</b>
3.1. Вплив N-(фосфонометил)гліцину на показники росту за коротко- та довготривалого впливу .....	25
3.2. Оцінка рівня окремих показників про- та антиоксидантної систем.....	37
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	<b>43</b>
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	<b>44</b>
<b>ДОДАТКИ</b> .....	<b>51</b>

## ВСТУП

Масове та тривале застосування гербіцидів, зокрема N-(фосфометил)гліцин, призводить до їх повсюдного накопичення в навколишньому середовищі. В останні роки виникли серйозні занепокоєння щодо шкідливих побічних ефектів гербіциду та АМРА (амінометилфосфонова кислота), що є основним метаболітом N-фосфометилгліцину, на життєдіяльність рослин, тварин, мікроорганізмів та людини. Ця сполука (N-(фосфометил)гліцин) є системним гербіцидом широкого спектру дії, який застосовується для боротьби з однорічними і багаторічними бур'янами. Біоцидна активність N-(фосфометил)гліцину пов'язана з інгібуванням ферменту 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (EPSPS). Він блокує шосту реакцію в шикіматному шляху (перетворення шикімат-3-фосфату в EPSP), яка необхідна для синтезу ароматичних амінокислот і вторинних метаболітів, що виконують захисні функції в рослинах і багатьох мікроорганізмах [1, 2].

Не дивлячись на значний інтерес наукової спільноти до проблеми забруднення довкілля гербіцидами, на сьогодні все ще недостатньо вивчено механізми його взаємодії з мікроорганізмами, зокрема дріжджами. Найбільше досліджень зосереджено на прокаріотах, тоді як дріжджі, котрі мають високий біотехнологічний потенціал у процесах біодеградації, залишаються невідомі в цьому контексті.

*Rhodotorula rubra* та *Rhodotorula minuta* є одноклітинними грибами, що характеризуються типовою клітинною структурою, властивою дріжджам, здатністю до утворення пігментів та відсутністю справжнього міцелію [3].

Представники роду *Rhodotorula* відзначаються високою толерантністю до несприятливих умов середовища, зокрема до присутності ксенобіотиків і токсикантів антропогенного походження. Завдяки метаболічній гнучкості ці дріжджі здатні виживати та функціонувати в агресивних екологічних нішах, що обумовлює інтерес до них як до потенційних агентів у технологіях мікробної деструкції забруднювачів. Досвід застосування *Rhodotorula* у

біоремедіації інших органічних сполук – таких як хлорорганічні пестициди, ПАР та важкі метали – свідчить про наявність у них необхідних ферментативних систем. Щодо N-(фосфометил)гліцину, ця здатність залишається предметом наукового аналізу, проте наявні дані вже вказують на перспективність подальших досліджень у цьому напрямі [3, 4, 5, 6].

Виходячи із вищесказаного, метою нашої роботи було дослідження коротко- та довготривалого впливу N-фосфометилгліцину на культури *R. minuta* та *R. rubra*.

Відповідно до мети поставлені наступні завдання:

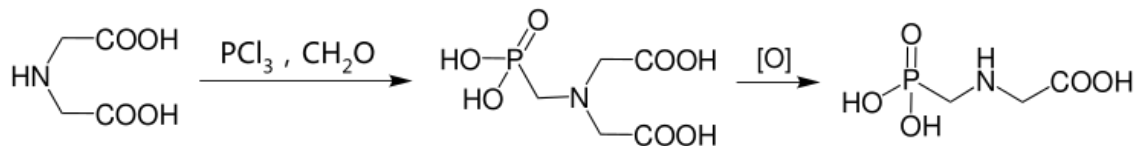
- Дослідити вплив різних концентрацій N-(фосфометил)гліцину на ріст дріжджів *Rhodotorula minuta* і *Rhodotorula rubra* за коротко- та довготривалої дії;
- Проаналізувати можливість утилізації N-(фосфометил)гліцину *Rhodotorula spp.* шляхом визначення вмісту неорганічного фосфору як кінцевого продукту за умов тривалого культивування.
- Оцінити зміни вмісту ТБК-активних продуктів, каротиноїдів, екзополісахаридів у біомасі дріжджів роду *Rhodotorula* за умов довготривалого культивування;

# 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

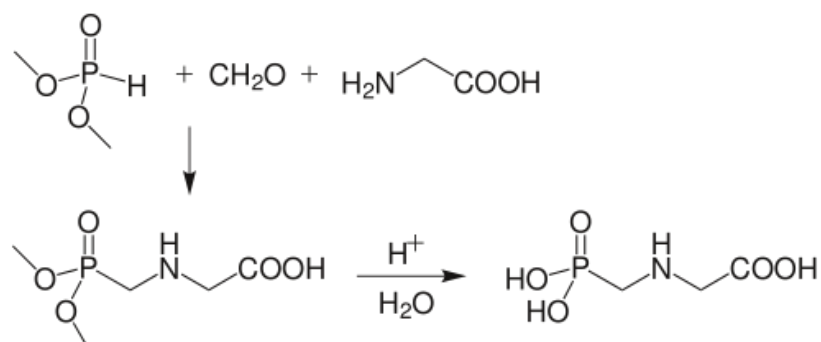
## 1.1. Характеристика N-(фосфометил)гліцину

Гліфосат (N-(фосфометил)гліцин) є органічною сполукою, що належить до класу фосфонатів. Його хімічна формула –  $C_3H_8NO_5P$ , а молярна маса становить 169,07 г/моль. Молекула гліфосату складається з гліцинової основи, до якої приєднано фосфометильну групу. Це робить його амфотерною сполукою, здатною діяти як кислота або основа залежно від рН середовища [7, 8].

Для промислового синтезу гліфосату використовуються два основні підходи, обидва з яких здійснюються за допомогою реакції Кабачника-Філдса. Перший полягає у взаємодії імінодіоцтової кислоти та формальдегіду з фосфористою кислотою (іноді утворюється *in situ* з трихлориду фосфору з використанням води, що утворюється в результаті реакції Манніха перших двох реагентів). Декарбоксілювання продукту гідрофосфонілювання дає бажаний продукт гліфосату. Імінодіоцтову кислоту, зазвичай, отримують на місці різними методами залежно від наявності реагенту [7].



Для другого способу використовують гліцин замість імінодіоцтової кислоти. Це дозволяє уникнути необхідності декарбоксілювання, але вимагає ретельнішого контролю стехіометрії, оскільки первинний амін може реагувати з будь-яким надлишком формальдегіду з утворенням бісгідроксиметилгліцину, який необхідно гідролізувати під час обробки для отримання бажаного продукту [7].



Завдяки своїм хімічним властивостям гліфосат активно використовується як системний гербіцид, ефективний проти широкого спектра бур'янів [8].

N-(фосфометил)гліцин, як інгібітор ферментів шикіматного шляху, може впливати на біосинтез фенілаланіну, тирозину та триптофану – амінокислот, що є незамінними компонентами білків, вторинних метаболітів, а також антиоксидантних сполук. Порушення їх синтезу впливає на білковий обмін, клітинний поділ і загальну життєздатність клітин [9].

Гліфосат є структурним аналогом фосфоенолпірувату (ФЕП) і, відповідно, конкурентним інгібітором ферменту 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (EPSP-синтаза). Цей фермент каталізує утворення 5-енолпірувілшикімат-3-фосфату (EPSP) із шикімат-3-фосфату та фосфоенолпірувату – одну з ключових реакцій шикіматного шляху. Шикіматний шлях – це життєво важлива метаболічна система, яка функціонує виключно у рослин, грибів, бактерій та деяких найпростіших. У тварин цей шлях відсутній, тому ароматичні амінокислоти є для них незамінними. Через це він є ідеальною мішенню для гербіцидів з низьким ризиком токсичності для тварин [10, 11].

Інгібування EPSP-синтази гліфосатом порушує утворення тріади ароматичних амінокислот – L-фенілаланіну, L-тирозину та L-триптофану; детальніше можна прослідкувати на рис. 1.1 [12].

У ґрунті гліфосат зв'язується з неорганічними компонентами, особливо мінералами з зарядом, такими як оксиди алюмінію та заліза. Його сорбція сильніша, ніж у більшості гербіцидів, і він конкурує з фосфатами за місця зв'язування, тому фосфатні добрива можуть призводити до повторної мобілізації гліфосату. У крайніх випадках це може спричинити фітотоксичність через наявність вільного гліфосату [13].

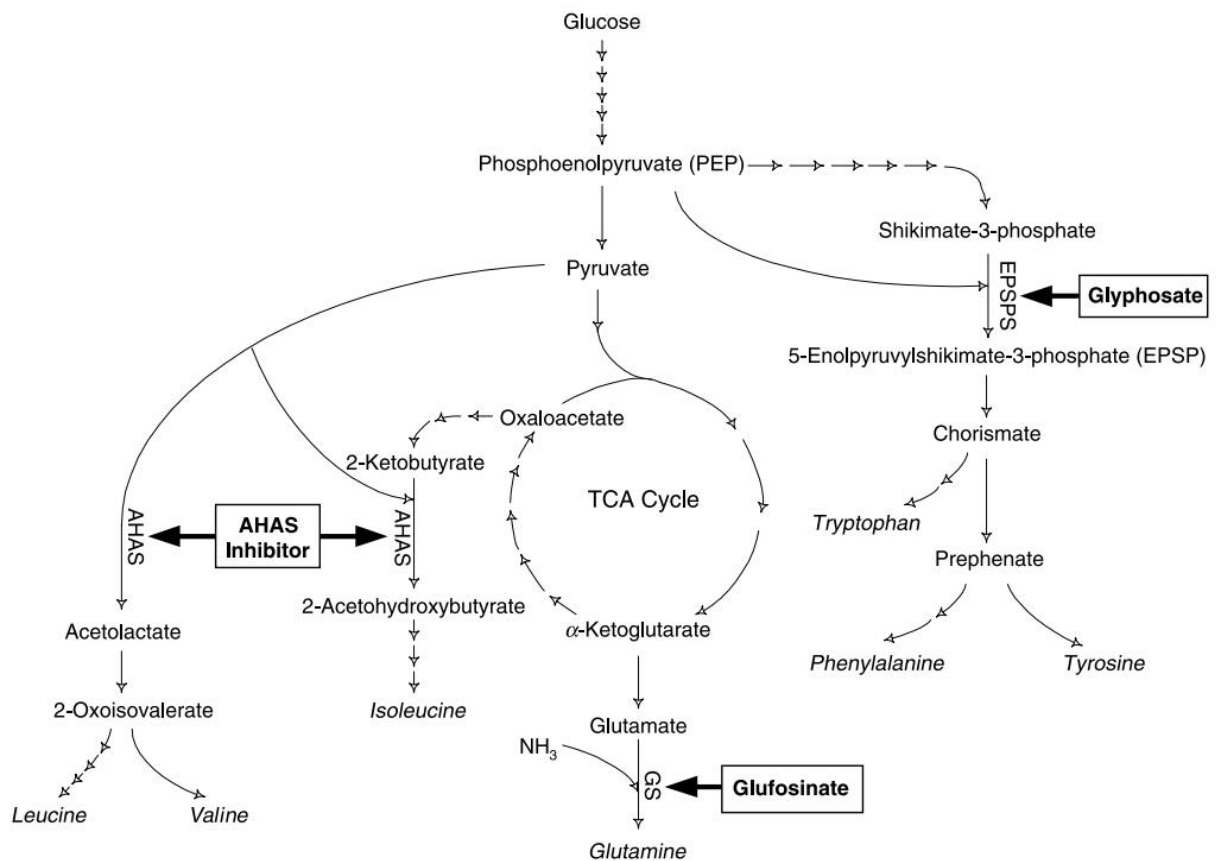


Рис. 1.1. Шляхи біосинтезу амінокислот з розгалуженим ланцюгом, ароматичних амінокислот та глутаміну в рослинах: три ферменти, які пригнічуються інгібіторами біосинтезу амінокислот [14].

Гліфосат та його продукт розпаду АМРА пригнічують активність антиоксидантних ферментів та викликають накопичення активних форм кисню, які спричиняють фізіологічні порушення та пошкодження клітин [15].

## 1.2. Шляхи перетворення та біодеградації N-(фосфометил)гліцину

Процеси метаболізму гліфосату переважно вивчені у бактерій. Дані щодо грибів, рослин і тварин є лише попередніми й стосуються ймовірних шляхів його трансформації. Серед вивчених бактерій низка видів використовує його як джерело фосфору, що передбачає наявність у них ферментів, здатних розривати зв'язок С-Р (вуглець–фосфор).

Розпад гліфосату в ґрунті майже повністю залежить від мікроорганізмів: у стерильному ґрунті він відбувається набагато повільніше. Є два основні ферментативні шляхи розкладу: шлях за участі гліфосат-оксидоредуктази, що призводить до утворення АМРА та гліюксилату, і шлях за участі С-Р-ліази, який дає саркозин (N-метилгліцин) та неорганічний фосфат. Саркозин у ґрунті розкладається швидше, ніж АМРА, що може впливати на уявлення про ефективність обох шляхів [16].

Відповідно, у бактерій виявлено два шляхи ферментативного розщеплення гліфосату, а саме: пряме розщеплення зв'язку С-Р, в результаті чого утворюється саркозин і неорганічний фосфат (Pi); розщеплення зв'язку С-N, з утворенням гліюксилату і АМРА. У першому випадку хімічно інертний зв'язок С-Р руйнується складним мультиензимним комплексом, відомим як С-Р ліаза. С-Р ліази включають компоненти, відповідальні за захоплення фосфонатів клітиною, регуляторні та допоміжні білки, а також самі ферменти, що каталізують розрив зв'язку С-Р. Через складність С-Р ліази та її незворотну інактивацію в лізованих клітинах механізм деградації фосфонатів цим шляхом залишався загадковим майже 30 років. Лише нещодавно були запропоновані перші гіпотези щодо її можливої організації [17].

Раніше вважалося, що С-Р ліази неспецифічні й один мультиферментний комплекс здатний розщеплювати цілий спектр алкіл- та аміноалкілфосфонатів, включаючи гліфосат. Однак спостереження показали, що штами-деструктори гліфосату використовують С-Р ліазу дещо інакше, ніж для інших фосфонатів. Це дозволило припустити існування двох різних С-Р ліаз: одна подібна до тієї, що є в *E. coli* і не розщеплює гліфосат, а інша – специфічна лише до гліфосату, і розщеплює його з утворенням саркозину та фосфору [18].

Механізм деградації гліфосату за допомогою С-Р ліази поки що недостатньо вивчений як з біохімічної, так і з молекулярно-біологічної точок зору. Наразі він може розглядатися лише за аналогією з відомими реакціями

в *E. coli*. Походження ферментного комплексу з такою вузькою специфічністю до гліфосату залишається неясним [19].

Здатність метаболізувати гліфосат з утворенням саркозину також виявлена у бактерій, які раніше не зазнавали впливу цього гербіциду, що дозволяє припустити існування природних аналогів гліфосату – потенційних субстратів для таких ліаз. У лабораторних умовах бактерії з гліфосат-специфічними C–P ліазами ефективно знешкоджують гербіцид, використовуючи його як єдине джерело фосфору. Однак у природних умовах їх ефективність значно знижується, оскільки експресія C–P ліази активується лише у відповідь на внутрішньоклітинний дефіцит фосфору, що рідко трапляється в довкіллі [19].

У більшості відомих гліфосат-руйнуючих бактерій гліюксилат далі метаболізується через гліюксилатний шлях циклу Кребса, тоді як АМРА експортується з клітини. Лише деякі бактеріальні штами здатні надалі перетворювати АМРА за участю C–P ліази типу *E. coli* з утворенням метиламіну та P<sub>i</sub>. Також є дані, що свідчать про альтернативний шлях перетворення АМРА, подібний до метаболізму 2-аміноетилфосфонату (2АЕР), який включає трансмінацію піруватзалежною амінотрансферазою та гідролітичне розщеплення C–P зв'язку. Проте висока специфічність відомих амінотрансфераз до 2АЕР і відповідних гідролаз робить малоімовірним ідентичний механізм для АМРА [20, 4].

Накопичуються дані, які свідчать, що крім двох основних шляхів деградації гліфосату в бактерій, існують і альтернативні. Нещодавно було показано, що гліцин-оксидаза також здатна розщеплювати гліфосат з утворенням АМРА та гліюксилату [5].

### **1.3. Дріжджі роду *Rhodotorula* та їхня роль в утилізації шкідливих продуктів**

Клітини дріжджів, зокрема представників роду *Rhodotorula*, мають типовий еукаріотичний тип організації. Їхні клітини одноядерні, мають

щільну клітинну стінку, цитоплазматичну мембрану, органели (ядро, мітохондрії, вакуолі, рибосоми, ендоплазматичний ретикулум), а також можуть накопичувати резервні речовини – ліпіди та глікоген [21].

Для глибшого розуміння біологічних та біотехнологічних особливостей дріжджів *Rhodotorula rubra* та *Rhodotorula minuta* доцільно порівняти ці два види. Обидва належать до базидіоміцетних дріжджів, проте відрізняються за морфологічними, фізіолого-біохімічними властивостями, здатністю до пігментоутворення та толерантністю до стресових чинників (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

**Порівняльна характеристика дріжджів *Rhodotorula rubra* та *Rhodotorula minuta***

Ознака	Види дріжджів	
	<i>Rhodotorula rubra</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>
Колонії на середовищі	Середнього розміру, опуклі, гладкі, блискучі, червоно-оранжевого або рожевого кольору	Менші за розміром, рожево-кремові, матові, з менш насиченим забарвленням; можуть виглядати світлішими
Пігментоутворення	Виражене; інтенсивний синтез торуліну, торулародину та $\beta$ -каротину	Пігментоутворення слабше; кількість каротиноїдів значно менша
Спосіб розмноження	Безстатеве брунькування; псевдогіфи не утворюються	Аналогічно, брунькування; гіфи та спори відсутні
Температурний оптимум росту	25-30 °С, здатна рости при 35 °С	Оптимум 20-28 °С, чутливіша до високих температур
Вуглеводне живлення	Використовує широкий спектр цукрів: глюкоза, галактоза, мальтоза, рафіноза, манітол	Менш широкий спектр; здебільшого глюкоза, сахароза, слабше росте на галактозі
Азотисте живлення	Добре використовує нітрати, амоній, амінокислоти	Слабше засвоює нітрати, чутливіша до нестачі азоту
Толерантність до стресу (солі, токсиканти)	Стійка до NaCl (до 6-8%), проявляє адаптацію до деяких	Менш стійка до солей та токсикантів, поріг толерантності нижчий

	пестицидів і важких металів	
Антиоксидантна активність	Висока завдяки синтезу каротиноїдів та активації ферментів (CAT, SOD)	Слабша антиоксидантна відповідь; нижчий вміст пігментів і антиоксидантних ферментів

У медичному аспекті *Rhodotorula spp.*, зокрема *R. rubra*, можуть бути умовно-патогенними мікроорганізмами, викликаючи опортуністичні інфекції у людей з ослабленим імунітетом. Вони стають причиною фунгемій, менінгітів, перитонітів та інших інфекцій, пов'язаних із імуносупресивною терапією або колонізацією поверхні внутрішньовенних катетерів, що створює умови для інвазивного зараження [3].

Однією з характерних властивостей дріжджів *Rhodotorula rubra* є активне утворення пігментів. Основними серед них є каротиноїди – численна та біологічно значуща група природних сполук, що належать до класу терпенів. Ці пігменти трапляються як у фотосинтезуючих, так і в нефотосинтезуючих організмах. Вони можуть синтезуватися *de novo* у рослин, деяких мікроорганізмів, зокрема бактерій і грибів, тоді як тварини й людина отримують їх з раціону [22].

Каротиноїди побудовані з восьми ізопренових одиниць (C<sub>5</sub>), при цьому їх структура може включати одне або два іононових (циклогексенових) кільця на кінцях молекули. Їхня хромофорна система утворена полієновим ланцюгом із послідовно спряжених подвійних зв'язків, що забезпечує поглинання світла в межах 400–500 нм та зумовлює характерне жовто-оранжеве забарвлення. Каротиноїди, які не містять кисневих функціональних груп, класифікуються як каротини (наприклад, лікопін, β-каротин і його ізомери), тоді як їхні оксигеновмісні похідні належать до групи ксантофілів (зокрема лютеїн, зеаксантин, астаксантин, кантаксантин) [22].

Чисті каротиноїди є хімічно нестабільними: вони швидко розпадаються

під впливом ультрафіолетового випромінювання, кисню, високих температур, а також у присутності кислот або лугів, що спричиняє їхнє окиснення та деградацію [22].

Бета-каротин, основний попередник вітаміну А, є розповсюдженою сполукою, якій притаманні «іммунні» та антиоксидантні властивості.

Структурно цей каротиноїд визначається як полієн з 11 спряженими подвійними зв'язками та двома  $\beta$ -іононовими кільцями на кожному кінці. Конформація спряжених подвійних зв'язків робить їх більш схильними до ізомеризації та окиснення, що спричиняє деградацію. Крім того, конформація  $\beta$ -каротину безпосередньо впливає на його перетворення на вітамін А та його дію в організмі [23].

Торулін – це ненасичений лінійний каротиноїд із 13 подвійними зв'язками. Завдяки розгалуженій системі спряжених подвійних зв'язків, молекула ефективно поглинає світло в межах 470-490 нм, що зумовлює інтенсивне забарвлення. Молекула не містить оксигруп, що робить її гідрофобною, і вона вбудовується переважно в гідрофобні частини мембран. Функціонально торулін виконує фотопротекторну роль, стабілізує мембрани, знижує пероксидне окиснення ліпідів і захищає клітини від фотоіндукованого стресу [24].

Торулародин є окисненим аналогом торуліну – він містить карбоксильну групу (-COOH), яка надає йому слабку полярність і дозволяє розташовуватись у більш гідрофільних зонах клітинної оболонки. Торулародин має подібний спектр поглинання до  $\beta$ -каротину, але його антиоксидантна здатність є вищою завдяки наявності функціональної групи, яка активніше взаємодіє з вільними радикалами. Цей пігмент є ключовим захисним фактором для клітин *Rhodotorula* при впливі токсикантів, УФ-випромінювання, важких металів та інших стресових агентів. Він нейтралізує супероксидний аніон ( $O_2^{\cdot-}$ ) та пероксид водню ( $H_2O_2$ ), а також підтримує редокс-баланс [24].

Враховуючи вищезазначене, ці дріжджі досліджують як потенційних

продуцентів каротиноїдів – природних антиоксидантів, які можуть бути використані в харчовій промисловості, косметичці та фармацевтиці. Крім того, представники роду *Rhodotorula* мають здатність до біоаккумуляції важких металів, що робить їх перспективними для очищення забруднених середовищ (біоремедіація).

Також ці мікроскопічні гриби (особливо *R. mucilaginosa*, *R. glutinis*, *R. kratochvilovae*) виявляють високий потенціал до деструкції різноманітних ксенобіотичних сполук – як органічної, так і неорганічної природи. Завдяки поєднанню толерантності до стресів, високої адаптивності, активної антиоксидантної системи та здатності до секреції специфічних ферментів, дані мікроорганізми розглядаються як перспективні агенти в біотехнологіях очищення довкілля (біоремедіації) [25].

Хоча прямі дослідження щодо ролі *Rhodotorula* у збереженні балансу мікробіоценозів за присутності гліфосату обмежені, існують свідчення їхньої участі в очищенні середовищ від інших токсичних сполук. Зокрема, дослідження показали, що *Rhodotorula* може ефективно адсорбувати шестивалентний хром з водних розчинів, використовуючи інактивовану біомасу [26].

Крім того, *Rhodotorula* виявляється в середовищах, забруднених поліциклічними ароматичними вуглеводнями (ПАВ), де вони демонструють здатність до їхньої деградації. Наприклад, *R. glutinis* та *R. rubra* показали високу ефективність у розкладанні фенантрени, а також брали участь у деградації інших ПАВ у змішаних грибкових спільнотах [27].

Дослідження також показали, що штам *Rhodotorula mucilaginosa* RM-DY21 здатний ефективно деградувати хлорпірифос, досягаючи рівня деградації 70,04% за 32 години. Оптимізація умов культивування дозволила підвищити цей показник до 83,86%. Цей штам також демонструє здатність використовувати хлорпірифос, ометоат та трихлорфон як єдине джерело вуглецю, що свідчить про його потенціал у біоремедіації середовищ, забруднених органофосфорними пестицидами [28].

У роботах, присвячених вивченню здатності дріжджів до деградації пропіконазолу, було встановлено, що штам *Rhodotorula glutinis* Rg 55 здатний деградувати до 75% цього фунгіциду протягом 48 годин інкубації. Це свідчить про потенціал *Rhodotorula* у біоремедіації середовищ, забруднених різними пестицидами, включаючи фунгіциди [29].

Враховуючи здатність *Rhodotorula spp.* до біодеградації різноманітних пестицидів, включаючи гліфосат, хлорпірифос та пропіконазол, ці дріжджі мають потенціал для використання у біотехнологічних процесах очищення забруднених середовищ [30, 31].

Окрім органічних забруднювачів, *Rhodotorula* проявляє високу активність до поглинання важких металів, таких як кадмій, свинець, мідь, хром, нікель і ртуть. Це зумовлено здатністю до біоаккумуляції та біосорбції, що здійснюється за участю клітинної стінки, насиченої гідроксильними, карбоксильними й аміногрупами, які формують комплекси з металами. Деякі штами здатні також здійснювати активний транспорт і внутрішньоклітинне накопичення йонів металів у вакуолях. У дослідженні Grujić та ін. [31] було показано, що *R. mucilaginosa* ефективно видаляють іони ртуті з водних розчинів. Це свідчить про важливу роль мікроорганізмів у стійкості до металотоксичності та видаленні токсикантів.

Фізіологічна адаптація *Rhodotorula* до токсикантів базується на підвищенні активності антиоксидантних ферментів (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза), синтезі захисних молекул (трегалоза, глутатіон), індукції ABC-транспортерів та зміні мембранного ліпідного складу.

Незважаючи на традиційне уявлення про вибірковість дії гліфосату, все більше досліджень фіксують негативний вплив речовини на нечутливі організми, включаючи еукаріотичні. Оскільки експериментальні дані про дію гербіциду на *Rhodotorula* залишаються поодинокими, дана проблема потребує подальших досліджень.

Використання даного роду дріжджів у біоремедіації доквілля від

гліфосату очевидно матиме кілька потенційних переваг [3]:

- Стійкість до екстремальних умов. *Rhodotorula* може виживати в умовах високої токсичності, що робить їх придатними для очищення сильно забруднених середовищ.
- Біосорбційні властивості. Здатність до адсорбції токсичних металів та органічних сполук свідчить про потенціал у видаленні гліфосату з водних та ґрунтових середовищ.
- Участь у змішаних мікробних спільнотах. Дріжджі можуть ефективно працювати в консорціумах з іншими мікроорганізмами, що може підвищити ефективність біодеградації гліфосату.

## 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Матеріали досліджень

Матеріалом для нашого дослідження виступали чисті культури мікроорганізмів *Rhodotorula rubra* та *Rhodotorula minuta* з колекції музейних культур кафедри біохімії та біотехнології ННІБХБ, що люб'язно надані Інститутом мікробіології і вірусології імені Д.К.Заболотного.

*R. rubra* та *R. minuta* належать до царства *Fungi*, відділу *Basidiomycota*, класу *Microbotryomycetes*, порядку *Sporidiobolales*, родини *Sporidiobolaceae*, роду *Rhodotorula*. Цей рід об'єднує базидієвмісні дріжджі, які не утворюють аскоспор, але можуть формувати спори, що вивільняються активним способом [3].

*Rhodotorula spp.* є хемоорганогетеротрофами, що використовують широкий спектр органічних сполук як джерела вуглецю й енергії. Вони здатні засвоювати моно- та дисахариди (глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу), спирти (етанол, гліцерин), а також деякі органічні кислоти. У більшості штамів основним шляхом утилізації цукрів є окисне перетворення, тоді як здатність до їх ферментації проявляється не завжди.

Як джерело азоту використовують як органічні (пептон, амінокислоти), так і неорганічні сполуки (нітрати, амоній).

Багато штамів здатні синтезувати власні вітаміни, однак ріст значно посилюється у присутності біотину, тіаміну або інозиту.

*Rhodotorula* характеризуються також здатністю до накопичення ліпідів, особливо в умовах дефіциту азоту при надлишку вуглеводів, що створює передумови для їхнього використання як потенційних продуцентів мікробних ліпідів [3].

### 2.2. Схема дослідження

**Приготування поживних середовищ** здійснювали згідно рецепторних приписів. Рідке середовище Сабуро готували шляхом розчинення 10 г

пептону та 40 г глюкози в 1 л дистильованої води. Компоненти ретельно перемішували до повного розчинення. Тверде середовище Сабуро готували з використанням комерційної сухої суміші (62 г на 1 л дистильованої води). Стерилізували автоклавуванням при 120 °С протягом 15–20 хв.

**Отримання посівного матеріалу** здійснювали з використанням музейних штамів, які зберігалися на твердому поживному середовищі. Для підготовки передпосівного матеріалу з поверхні агаризованого середовища стерильними інструментами (бактеріологічна петля) отримували клітинну масу. Її вносили в асептичних умовах у рідке поживне середовище Сабуро в об'ємі 5 мл. Інкубацію проводили у стаціонарних умовах у термостаті за температури 28 °С протягом 48 год та відповідній аерації (100 об/хв).

**Для оцінки короткотривалого впливу N-(фосфонометил)гліцину** на інтенсивність росту дріжджових клітин культивування здійснювали у пробірках, де в 5 мл робочого об'єму містилося 10% інокуляту, стандартизованого за кількістю клітин та відповідні концентрації гліфосату – 2,5; 25; 50; 75; 100 та 125 мг/л. Зазначені концентрації отримували шляхом покрокового розведення основного розчину гліфосату з концентрацією 50 мг/мл до заданих значень. Вирощували каротиногенні дріжджі за температури 28 °С та відповідній аерації впродовж 72 год.

**Вплив N-(фосфонометил)гліцину на показники росту за довготривалого впливу** аналізували у серії лабораторних експериментів із використанням трьох робочих концентрацій гербіциду: 25, 75 та 125 мг/л. Усі складові вносили у стерильні конічні колби Ерленмейєра об'ємом 250 мл. Робочий об'єм ферментації – 50 мл, кількість стандартизованого інокуляту – 10%. Контрольний варіант не містив гліфосату та служив для оцінки базового рівня росту в умовах, ідентичних до експериментальних.

Культивування здійснювали у динамічних умовах при температурі 28 °С протягом 14 діб. Аерацію забезпечували шляхом періодичного розміщення колб на лабораторному шейкері зі швидкістю обертання 100 об/хв, що створювало оптимальні умови для аеробного метаболізму

дріжджових клітин. Динаміку росту оцінювали шляхом вимірювання кожної доби оптичної щільності культуральної рідини фотометрично при довжині хвилі 540 нм.

На кінець експерименту відділяли клітинну біомасу центрифугуванням, здійснювали деградацію клітин за допомогою ультразвуку (7200  $\mu$ A) та проводили дослідження біохімічних показників у супернатанті й біомасі.

Для **визначення** впливу N-(фосфометил)гліцину (гліфосату) на **життєздатність дріжджових клітин** використовували методіку підрахунку колонієутворювальних одиниць (**КУО**) на твердому поживному середовищі.

Для цього на поверхню поживного середовища вносили 1 мл дріжджової суспензії, яку відібрали на 14 день довготривалої експозиції. Попередньо культуру розвели у стерильному фізіологічному розчині (0,9 % NaCl) у 100 разів.

Інкубацію проводили у термостаті за температури 28 °C упродовж 72 год [32].

### 2.3. Методи дослідження

**Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів** (ПОЛ) оцінювали за вмістом **тіобарбітурат-активних продуктів (ТБКАП)**, що є вторинними метаболітами оксидативного ушкодження ліпідів. Метод ґрунтується на утворенні хромофорного комплексу між альдегідними похідними (насамперед малондіальдегідом) і тіобарбітуратом.

Для аналізу до 0,4 мл супернатанту додавали 3 мл 10 мМ фосфатного буфера ( $K^+/Na^+$ ) на основі 125 мМ KCl (рН 7,4), а також 0,5 мл 1 мМ розчину перманганату калію ( $KMnO_4$ ). Індукцію ПОЛ проводили шляхом дворазового додавання 125 мкл 10 мМ сульфату заліза(II) ( $FeSO_4$ ) з інтервалом 10 хвилин для імітації умов оксидативного стресу в присутності іонів перехідних металів.

Після завершення інкубації реакцію припиняли введенням

трихлороцтової кислоти (ТХУК), що забезпечувала осадження білків і зупинку подальших хімічних реакцій. Реакційні суміші піддавали центрифугуванню при 1500 об/хв протягом 10 хвилин для видалення осаду.

Супернатант (2 мл) переносили у чисту пробірку, додавали 0,5 мл 1 н розчину хлороводневої кислоти (HCl) та 1 мл 0,7 мМ розчину 2-тіобарбітурату (ТБК). Після ретельного перемішування проби інкубували на водяній бані при температурі +95°C протягом 20 хвилин для забезпечення повного утворення кольорового ТБК-комплексу.

Контрольні зразки обробляли за ідентичним протоколом, проте замість супернатанту використовували еквівалентний об'єм дистильованої води. Після завершення реакції проби охолоджували до кімнатної температури, після чого додавали 3 мл н-бутанолу, інтенсивно перемішували для екстракції комплексу в органічну фазу та повторно центрифугували за попереднім режимом.

Оптичну щільність бутанольного шару вимірювали при довжині хвилі 532 нм у кюветах зі стандартною товщиною шару 1 см.

Розрахунок концентрації ТБКАП здійснювали із використанням молярного коефіцієнта екстинкції, що становить  $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [33].

**Загальний вміст білків** визначали за методом Лоурі [34].

Для дослідження **вмісту неорганічних фосфатів (засвоєння фосфатів)** у якості аналітичного матеріалу використовували супернатант культуральної рідини. Центрифугування проводили при 3000 об/хв протягом 30 хвилин.

Підготовка реактивів здійснювалася згідно з такими умовами:

- розведений розчин нітратної кислоти: до 900 мл дистильованої води обережно додавали 140 мл концентрованої  $\text{HNO}_3$  з подальшим перемішуванням;
- 3% розчин амоній молібдату: 3 г  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  розчиняли у 100 мл дистильованої води;
- розчин аскорбінової кислоти: 2,16 г  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  розчиняли у 100 мл

дистильованої води, зберігали при температурі +4 °С;

- розчин калій антимонолітартрату: 0,34 г розчиняли у 500 мл дистильованої води.

Безпосередньо перед аналітичним визначенням готували змішаний реактив, шляхом поєднання 125 мл розведеної  $\text{HNO}_3$ , 50 мл розчину амоній молібдату, 50 мл розчину аскорбінової кислоти та 25 мл антимонолітартрату. Отриманий реактив використовували для візуалізації реакції фосфатів.

Розрахунки проводились за калібрувальною кривою, для побудови якої застосовували стандартний розчин ортофосфатів на основі калій дигідрофосфату ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

До 1 мл супернатанту додавали дистильовану воду, доводячи загальний об'єм до 25 мл, після чого вносять 2,5 мл змішаного реактиву та ретельно перемішують. Через 15 хвилин проводять вимірювання оптичної щільності, а концентрацію фосфатів визначають за допомогою калібрувальної кривої.

Вимірювання оптичної густини проводили на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 690 нм. Інтенсивність забарвлення порівнювали з калібрувальною кривою, побудованою за стандартними розчинами ортофосфатів.

Розрахунок вмісту іонів фосфатної кислоти ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) у мг/л проводили за наступною формулою:

$$x = \frac{c \times 50}{v}$$

де:

x – концентрація фосфатів у досліджуваному зразку, мг/л;

c – значення концентрації, визначене за калібрувальною кривою, мг/л;

v – об'єм аналізованої проби, мл (у цьому дослідженні  $v = 1$  мл) [35].

Розрахунок вмісту фосфору в іонах фосфатної кислоти проводили за такою формулою:

$$P_{\text{мг/л}} = [\text{PO}_4^{3-}]_{\text{мг/л}} \times \left( \frac{M_P}{M_{\text{PO}_4}} \right)$$

де:  $P_{\text{мг/л}}$  – шуканий вміст фосфору;

$[\text{PO}_4^{3-}]$  – масова концентрація фосфат-іону;

$M_P$  – атомна маса фосфору;

$M_{\text{PO}_4}$  – молекулярна маса  $\text{PO}_4^{3-}$ ;

Для розрахунку вмісту фосфору у N-(фосфонометил)гліцину:

$$P_{\text{мг/л}} = C_{\text{гліфосат}} \times \left( \frac{M_P}{M_{\text{гліфосат}}} \right)$$

де:  $P_{\text{мг/л}}$  – шуканий вміст фосфору;

$C_{\text{гліфосат}}$  – масова концентрація гліфосату в середовищі;

$M_P$  – атомна маса фосфору;

$M_{\text{гліфосат}}$  – молекулярна маса гліфосату;

Кількість фосфору, засвоєного дріжджами *R. rubra* та *R. minuta*, визначали як різницю між загальним вмістом фосфору в середовищі, що містить гліфосат, та концентрацією фосфат-іонів ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), наявних у середовищі. Таким чином, визначили частку фосфору, спожитого з гліфосату.

**Кількісний аналіз екзополісахаридів (ЕПС)** поверхневих структур здійснювали із застосуванням класичного фенольно-сірчаного методу.

Після завершення ферментаційного процесу (14 діб культивування у рідкому середовищі Сабуро), культуральну рідину центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хвилин. Надосадову фракцію, що не містила клітинної маси, відбирали, залишаючи осад, який промивали стандартним фізіологічним розчином (0,9% NaCl) для видалення залишків середовища. Отриману біомасу піддавали шзвуковій обробці (360 с) з метою руйнування клітинної оболонки та вивільнення зв'язаних ЕПС. Після обробки повторно центрифугували за попередніх умов. Надалі працювали із супернатантом, який у об'ємі 0,5 мл вносили у кожну реакційну пробірку як аналітичний зразок.

До зазначеного об'єму зразка додавали 0,5 мл 5% водного розчину фенолу, після чого швидко вносили 2,5 мл концентрованої  $H_2SO_4$  тонкою цівкою вздовж стінки пробірки при постійному перемішуванні. Така техніка внесення реагенту дозволяла уникнути локального перегріву, забезпечуючи однорідність реакційного середовища. Загальний об'єм реакційної суміші становив 3,5 мл. Суміші інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, що забезпечувало завершення реакції утворення кольорового комплексу.

Оптичну густину реакційних сумішей вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 490 нм у кварцових кюветах із товщиною шару 1 см. У ролі холостого контролю використовували дистильовану воду замість аналітичного зразка. Кількість екзополісахаридів у дослідних пробах визначали шляхом інтерполяції за калібрувальним графіком, побудованим на основі реакції із стандартними розчинами глюкози [36].

Для кількісної та якісної *оцінки каротиноїдного комплексу* використовували метод екстракції ацетоном із подальшим спектрофотометричним аналізом.

Після деструкції до 1 мл клітинної дріжджової суспензії додавали 2 мл ацетону аналітичної чистоти. Суміш ретельно перемішували та залишали на екстракцію в темному місці при кімнатній температурі упродовж 3 діб. Після завершення екстракції зразки центрифугували при 6000 об/хв для видалення нерозчинених залишків клітинного матеріалу.

Спектрофотометричне вимірювання оптичної густини екстрактів проводили при довжинах хвиль 450 нм, 509 нм і 537 нм із використанням відповідних світлофільтрів. Усі вимірювання проводили відносно контролю, що містив чистий ацетон. Довжина хвилі 450 нм відповідає максимуму поглинання  $\beta$ -каротину, тоді як абсорбційні піки при 509 нм і 537 нм є характерними для оксикаротиноїдних компонентів, зокрема торуліну та торулородину.

Розрахунок вмісту каротиноїдів проводили по перерахунку за формулами:

$$\beta - \text{каротин: } C_1 = 3,9 \times D_{450} + 1,8 \times D_{537} - 3,6 \times D_{509};$$

$$\text{торулін: } C_2 = 5,3 \times D_{509} - 6,7 \times D_{537};$$

$$\text{торулародин: } C_3 = 6,7 \times D_{537} - 1,1 \times D_{509};$$

Де:  $C_1$  – концентрація  $\beta$ -каротину, мкг/мл

$C_2$  – концентрація торуліну, мкг/мл

$C_3$  – концентрація торулародину, мкг/мл

$D_{450}$  – оптична густина розчину на довжині хвилі 450 нм

$D_{509}$  – оптична густина розчину на довжині хвилі 509 нм

$D_{537}$  – оптична густина розчину на довжині хвилі 537 нм

Для визначення загальної кількості використовували формулу:

$$A = C \times V/m, \text{ де:}$$

$A$  – вміст каротиноїдів, мкг/г;

$C$  – концентрація каротиноїдів (мкг/мл), визначена за піком поглинання;

$V$  – об'єм елюату, мл;

$m$  – маса сухої біомаси, використаної для екстракції, г [37].

**Статистична обробка результатів** проводилась за допомогою ПЗ Microsoft Excel. Усі дослідження проводили у 4-х кратній повторюваності (n=4).

Відмінності отриманих результатів вірогідні при рівні значимості  $p \leq 0,05$  за критерієм Стьюдента.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У сучасних умовах широкого використання гербіцидів на основі гліфосату в сільському господарстві постає необхідність детального вивчення їхнього впливу на нефітобіотичні компоненти екосистем, зокрема на ґрунтові мікроорганізми.

Дріжджі роду *Rhodotorula*, зокрема *R. minuta* та *R. rubra*, відіграють важливу роль у біогеохімічних циклах, беручи участь у трансформації органічних речовин, синтезі біологічно активних сполук та підтриманні мікробного різноманіття. Вивчення їхньої чутливості й адаптаційної відповіді до дії гліфосату є актуальним як у контексті оцінки екотоксикологічних ризиків, так і для розробки біотехнологічних підходів до біоремедіації забруднених ґрунтів. Таким чином, дослідження впливу N-(фосфонометил)гліцину на життєдіяльність *R. minuta* та *R. rubra* є своєчасним і має важливе прикладне та теоретичне значення для мікробіології, екології та аграрної науки.

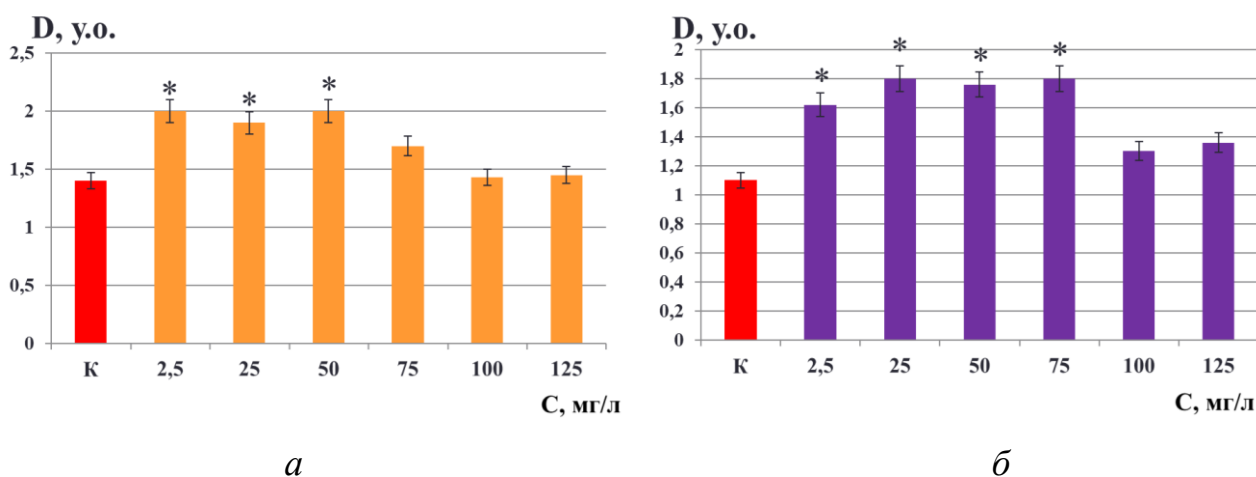
#### 3.1. Вплив N-(фосфонометил)гліцину на показники росту за коротко- та довготривалого впливу

Для оцінки впливу гліфосату на ріст дріжджів роду *Rhodotorula* було визначено зміни оптичної щільності культуральної рідини після 72 годин інкубації за різних концентрацій гербіциду. Оптична щільність, як непрямий показник біомаси, дозволяє судити про інтенсивність росту мікроорганізмів у рідкому середовищі.

На рис. 3.1.1.a спостерігаємо, що для *R. rubra* контрольне значення оптичної щільності склало 1,4. При додаванні гліфосату у концентрації 2,5 мг/л ріст культури вона зростає до 2,0 у.о., що перевищує значення контролю на 43%. За концентрації 25 мг/л оптична щільність дещо зменшилась, а при дії 50 мг/л гліфосату показник знову досягав 2,0 у.о.

Однак при подальшому підвищенні концентрації полютанту у середовищі не виявляли достовірних відмінностей у непрямих показниках

оцінки біомаси дослідних та контрольної групи: при 75 мг/л гліфосату щільність культури, у середньому, перевищувала лише на 21% контрольні значення, при 100 мг/л і 125 мг/л – різниця зовсім незначна. Це свідчить про те, що низькі концентрації гліфосату здатні стимулювати ріст *R.rubra*, тоді як вищі концентрації чинять індеферентний вплив, пригнічення росту культури не відзначали.



**Рис. 3.1.1.** Зміни щільності культур *Rhodotorula spp.* за умов короткочасного впливу N-(фосфонометил)гліцину

*Примітка* (тут і надалі):

\* – статистично достовірною різницею у порівнянні з контролем ( $p \leq 0,05$ )

*а* – зміни щільності культури *R. rubra*

*б* – зміни щільності культури *R. minuta*

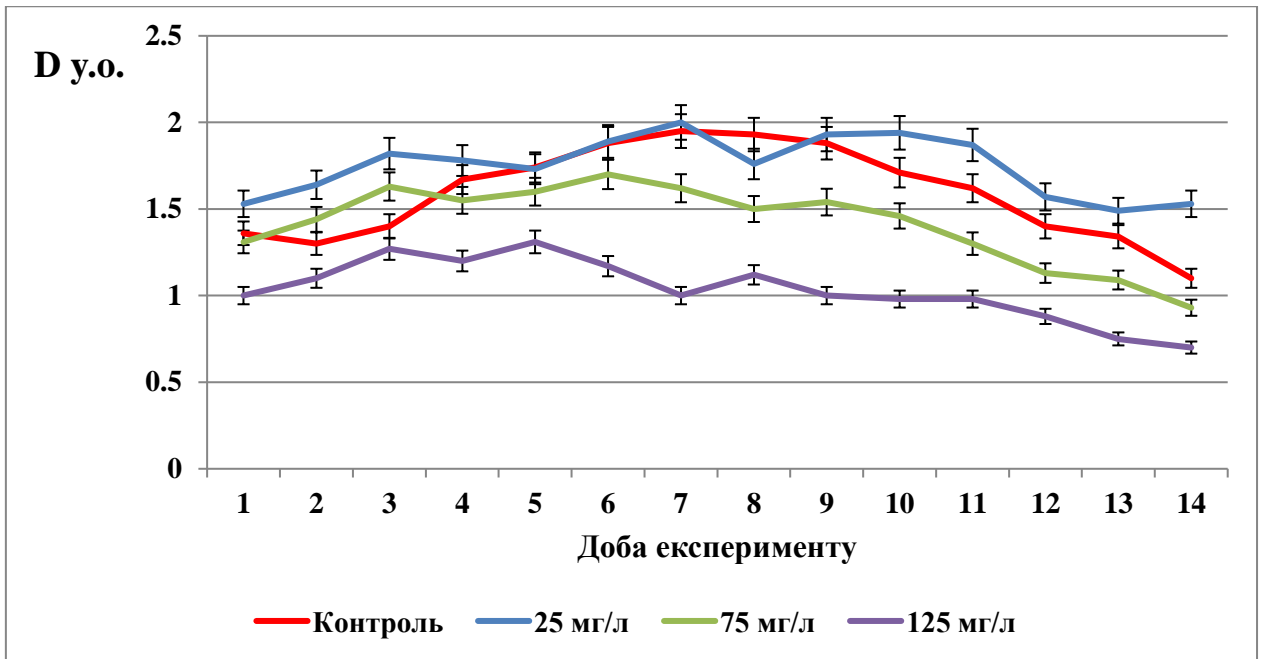
У випадку *R. minuta* (рис.3.1.1.б) контрольне значення склало 1,1 у.о. На відміну від *R. rubra*, цей вид виявив вищу стійкість до дії гліфосату. Уже при 2,5 мг/л ріст культури посилювався, а максимальних значень досягав при концентраціях 25 – 75 мг/л, перевищуючи контрольні значення в 1,6 рази. Однак при подальшому зростанні рівня гліфосату (100 мг/л, 125 мг/л) у середовищі культивування виявляли сповільнення приросту біомаси. Отже, для *R.minuta* характерні виражений стимулювальний ефект гліфосату за низьких та середніх концентрацій та помірна толерантність культури до вищих доз.

На нашу думку, дріжджі роду *Rhodotorula* демонструють потенційну здатність до адаптації в умовах дії гліфосату, що зумовлено сукупністю морфологічних та біохімічних характеристик. Важливою адаптивною ознакою є специфічна будова клітинної стінки, яка включає  $\beta$ -глюкани, манани, хітин і структурні білки. Ці компоненти можуть взаємодіяти з іонізованими формами ксенобіотиків, зокрема гліфосату, і таким чином обмежувати його транспортування крізь клітинну мембрану.

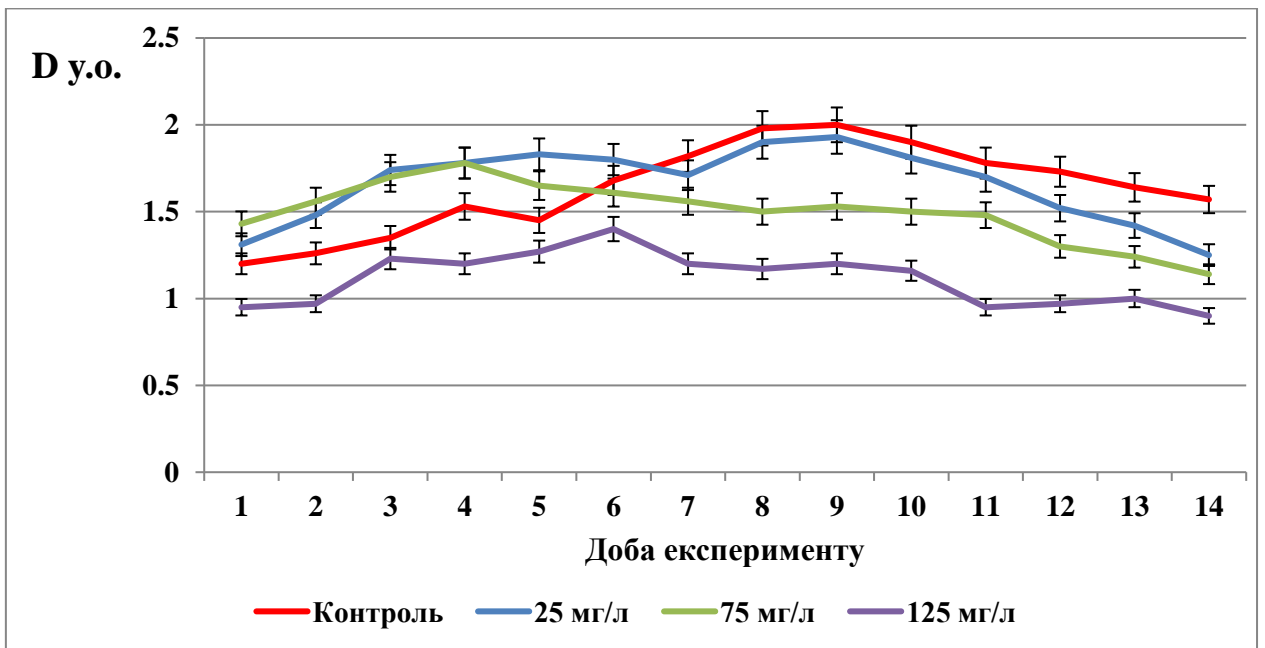
У клітинах представників *Rhodotorula* активні ферментні системи, зокрема оксидази, пероксидази та фосфатази, які можуть брати участь у процесах біотрансформації або детоксикації гліфосату та його метаболітів. За умов дефіциту легкодоступного фосфору в середовищі можливе індукування метаболічних шляхів, що забезпечують використання фосфонової групи гліфосату як альтернативного джерела фосфору, що додатково сприяє виживанню мікроорганізму в умовах токсичного стресу.

Отримані результати вказують на наявність вираженої дозозалежної токсичності гербіциду, однак реакція досліджуваних мікроорганізмів мала видоспецифічні особливості.

Оцінка довготривалого впливу (рис. 3.1.2.а) різних концентрацій гліфосату на розвиток культури *Rhodotorula rubra* показала наявність як стимулювального, так і пригнічувального ефекту залежно від дози полютанта та тривалості експозиції. У контрольному варіанті, без додавання гліфосату, на початкових етапах експерименту середнє значення оптичної густини становило 1,5 у.о.



а



б

**Рис. 3.1.2.** Динаміка щільності культур *Rhodotorula spp.* за умов довготривалої експозиції N-(фосфометил)гліцину в середовищі культивування

За умови внесення гліфосату в концентрації 25 мг/л, спостерігалось незначне підвищення біомаси культури. При збільшенні концентрації до 75 мг/л оптична густина культури зменшилась на 4 добу експерименту, що було

свідченням початку пригнічення росту культури під впливом гербіциду.

Найбільш виражений токсичний ефект було зафіксовано при концентрації 125 мг/л, коли оптична густина знизилася в 1,3 рази, що вказує на значне пригнічення росту *R. rubra*.

Оцінка впливу гліфосату на оптичну густину культури *R. minuta* (рис. 3.1.2.б) виявила тенденції, подібні до попереднього виду, але з менш вираженою реакцією на низькі дози. У контрольному варіанті середнє значення оптичної густини становило 1,6 у.о. При внесенні гліфосату в концентрації 25 мг/л спостерігалось незначне зростання густини, отже, на цьому рівні гербіцид майже не впливає на ріст культури. У разі застосування 75 мг/л середнє значення показника знизилось, а найнижчі його значення зареєстровані за дії 125 мг/л гліфосату.

Пояснення отриманих результатів можна частково знайти у сучасних даних щодо впливу гліфосату та гербіцидів на мікробні спільноти. Зокрема, відомо, що гліфосат пригнічує фермент EPSPS у шикіматному шляху, який присутній не лише у рослин, а й у деяких грибів і бактерій, що зумовлює потенційну чутливість мікроорганізмів до дії гербіциду. Водночас, після біодеградації гліфосат може бути використаний як джерело доступного карбону, що в окремих випадках навіть стимулює мікробний ріст [38].

Відомо, що різні види мікроорганізмів по-різному реагують на гліфосат: у деяких випадках спостерігається зниження грибкової біомаси та видової різноманітності, тоді як інші організми виявляють адаптаційні властивості або активніше ростуть у відповідь на низькі дози гербіциду [39].

Активація антиоксидантних та детоксикаційних систем є ключовим фактором виживання *Rhodotorula* в умовах присутності гліфосату. Проте, за умов тривалого або інтенсивного впливу, ці системи можуть виснажуватися, що призводить до зменшення життєздатності клітин, порушення метаболізму, зниження пігментоутворення та здатності до колонізації субстрату [3, 29, 40, 41, 42].

На нашу думку, результати довготривалої експозиції гліфосату можуть

бути зумовлені низкою біологічних і хімічних чинників. Насамперед, слід враховувати видові особливості досліджуваних дріжджів. Відомо, що склад і структура клітинної стінки (вміст хітину,  $\beta$ -глюканів, мананів) можуть впливати на здатність клітин до зв'язування токсикантів, зокрема гліфосату, і, відповідно, зменшувати його проникнення в клітину.

Також концентрація гербіциду є важливим чинником, який визначає характер його впливу. У низьких дозах гліфосат може виступати як джерело доступного карбону або фосфору, що тимчасово стимулює ріст і метаболічну активність мікроорганізмів. Проте в середніх і високих концентраціях гліфосат чинить цитотоксичну дію, пов'язану з пригніченням ферменту EPSPPS у клітинах мікроскопічних грибів, що порушує синтез ароматичних амінокислот – фенілаланіну, тирозину та триптофану.

Нарешті, тривалість експозиції має важливе значення. У перші дні можлива активація адаптивних реакцій. Однак упродовж 14 діб дія токсиканту може накопичуватись, що призводить до зниження ефективності захисних механізмів.

Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) є одним із ключових показників життєздатності мікроорганізмів і дозволяє оцінити здатність клітин до розмноження після дії певного фактора, зокрема стресового – хімічного, фізичного або біологічного.

У присутності різних концентрацій гліфосату відзначено зміни (табл. 3.1.) у чисельності КУО досліджуваних дріжджів, що свідчить про вплив гербіциду на життєздатність мікроорганізмів.

Таблиця. 3.1.

Кількість колонієутворюючих одиниць *Rhodotorula spp.* за умов довготривалої експозиції N-(фосфометил)гліцину

Концентрації гліфосату	<i>R. rubra</i>	<i>R. minuta</i>
Контроль	$5,3 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4 \pm 0,7 \times 10^4$
25 мг/л	$5,8 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$

75 мг/л	$4,2 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$
125 мг/л	$2,7 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$

У контрольному варіанті, в середньому, кількість КУО *R. rubra* становила  $5,3 \times 10^4$  КУО/мл, а *R. minuta* –  $4,9 \times 10^4$  КУО/мл. За концентрації 25 мг/л обидва штами не демонстрували суттєвого зростання чисельності: у *R. rubra* – до  $5,8 \times 10^4$  КУО/мл, а у *R. minuta* – до  $5,2 \times 10^4$  КУО/мл.

Подальше підвищення концентрації гліфосату призводило до поступового зниження кількості життєздатних клітин. При 75 мг/л чисельність КУО знизилася, в середньому, знизилася, в середньому, на 20% – до  $4,2 \times 10^4$  КУО/мл – *R. rubra*, – до  $3,8 \times 10^4$  КУО/мл *R. minuta*.

Найбільше інгібування росту спостерігалось за концентрації 125 мг/л: чисельність живих клітин *R. rubra* становила лише  $2,7 \times 10^4$  КУО/мл (зниження майже у 2 рази), тоді як *R. minuta* зменшилася до  $2,2 \times 10^4$  КУО/мл (45% від контролю).

Отже, вплив гліфосату на колонієутворюючу здатність дріжджів є дозозалежним: при низькій концентрації не фіксується ніяких достовірних змін, тоді як за високих доз відзначається чітке інгібування росту, причому *Rhodotorula minuta* виявилася дещо чутливішою до токсичного навантаження порівняно з *Rhodotorula rubra*.

Пряких експериментальних даних про вплив гліфосату на *R. rubra* та *R. minuta* наразі небагато. Проте експериментальні спостереження в лабораторних умовах підтверджують, що гліфосат у концентраціях 84,54-338,14 мг/л може пригнічувати ріст колоній *R. rubra* на твердих середовищах на 20-60% у порівнянні з контролем. Це супроводжується зменшенням в'язкості біомаси, зниженням рН культуральної рідини та уповільненням брунькування [3].

На нашу думку, одним із можливих пояснень спостереженого зростання кількості колонієутворюючих одиниць дріжджів за наявності низької концентрації гліфосату (25 мг/л) є прояв горметичного ефекту.

Відомо, що низькі дози деяких токсичних речовин можуть чинити стимулювальну дію на клітини завдяки активації захисних систем і мобілізації метаболічних резервів. Такий слабкий стресовий вплив потенційно стимулює стартові процеси колонієутворення, зокрема проліферацію та ріст дріжджових клітин.

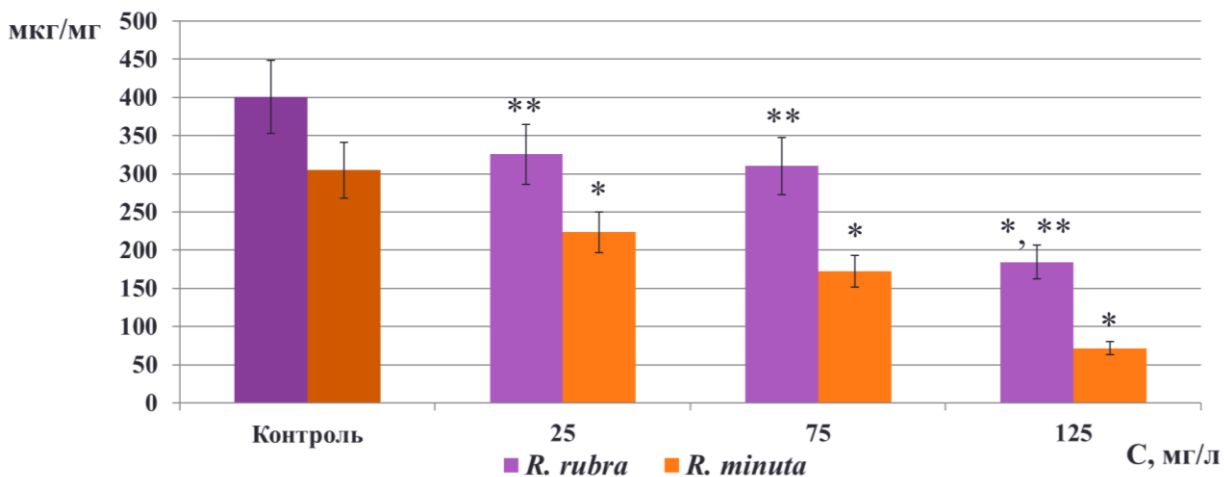
З іншого боку, пригнічення росту колоній при високих концентраціях гліфосату (75 та 125 мг/л) може бути зумовлене його токсичною дією, яка реалізується через інгібування ферментативних систем, необхідних для біосинтезу амінокислот, або через індукцію оксидативного стресу. Це знижує швидкість поділу та життєздатність клітин ще на ранніх стадіях росту, що підтверджують наші попередні дослідження.

Екзополісахариди (ЕПС) – це унікальні полімери, що утворюються живими організмами, такими як водорості, гриби та бактерії, для захисту від факторів навколишнього середовища [43].

У складі поверхневих капсул мікроорганізмів, екзополісахариди є ключовим структурним компонентом. Ця матриця складається з полісахаридів, білків, ліпідів та інших сполук, що забезпечують зчеплення клітин і взаємодію з навколишнім середовищем, зокрема сорбцію забруднювачів [44].

У ході експерименту було досліджено вплив гліфосату в концентраціях 25 мг/л, 75 мг/л та 125 мг/л на синтез зв'язаних ЕПС у дріжджів.

Нами зареєстровано (рис. 3.1.3), що у контрольному варіанті без додавання гліфосату вміст зв'язаних екзополісахаридів у клітинній біомасі *R. rubra* становив, у середньому, 401 мкг/мг, тоді як у *R. minuta* – 305 мкг/мг.



**Рис. 3.1.3.** Вміст екзополісахаридів у біомасі *Rhodotorula spp.* за наявності різних концентрацій N-(фосфометил)гліцину після 14-денної експозиції

*Примітка:* \*\* – статистична достовірна різниця між двома видами.

Як і для попередніх проаналізованих показників відзначено концентраційно та видозалежні особливості.

За концентрації гліфосату 25 мг/л вміст ЕПС у *R. rubra* знизився несуттєво, для *R. minuta* – майже на 27%. За дії 75 мг/л гліфосату у *R. rubra* відзначили подальше, хоч і незначне, зниження вмісту ЕПС, а для *R. minuta* цей показник був нижчим за контрольні значення в 1,4 рази.

Найбільш виражене пригнічення утворення екзополісахаридів зафіксовано при 125 мг/л гліфосату – більш ніж удвічі для *R. rubra* та близько у 4 рази – для *R. minuta*.

Літературні дані вказують на неоднозначний ефект пестицидів щодо продукції ЕПС. Відомо, що під впливом гліфосату у концентрації 0,1 мг/л відбувається активізація продукції ЕПС, особливо в присутності допоміжних речовин гербіцидів на основі гліфосату. Основними продуцентами ЕПС у цих умовах виступають гетеротрофні мікроорганізми. Така інтенсивна секреція ЕПС розглядається як захисна реакція біоплівкових спільнот на стрес, спричинений забруднювачами [45].

У роботі Ahemad & Malik було встановлено, що бактерії *Rhizobium*

починали інтенсивно продукувати ЕПС у відповідь на пестицидний стрес. Це явище пояснюється тим, що ЕПС утворюють захисний бар'єр навколо клітини, допомагаючи мікроорганізмам виживати в умовах токсичного навантаження. Аналогічну реакцію демонстрував ізолят R37, у якого при 1% Tilt 250EC спостерігалось зростання рівня ЕПС. Інші ізоляти (наприклад, R35 та R36) навпаки, показали зниження продукції екзополісахаридів при дії того ж пестициду, що вказує на індивідуальну або штамову чутливість до токсичного фактора [44].

Також було виявлено, що при високих концентраціях деяких пестицидів (наприклад, Taftog 40EC) більшість мікроорганізмів взагалі не змогли рости. У такому випадку ефекти вивчались при знижених концентраціях, де продукція ЕПС у деяких ізолятів поступово зростала із підвищенням концентрації пестициду. Водночас інші ізоляти демонстрували непередбачувану реакцію, де продукція ЕПС при 0,4% полютанту була нижчою, ніж при 0,3%. Це свідчить про нелінійність відповіді та складний характер метаболічних процесів, пов'язаних із синтезом екзополісахаридів [46].

Також у роботах з вивчення впливу гербіцидів на мікроорганізми встановлено, що 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д) у низьких концентраціях сприяє підвищенню синтезу ЕПС. Зокрема, спостерігалось зростання як загального вмісту ЕПС, так і обох фракцій – вивільнених (RPS) і капсульних, або зв'язаних (CPS), причому останні демонстрували найбільш виражене підвищення. При подальшому зростанні концентрації гербіциду активність ЕПС-продукції знижувалась, однак утворення CPS залишалось дещо підвищеним навіть на фоні загального пригнічення [47].

Вищий рівень екзополісахаридів у контрольному варіанті, особливо у *R. rubra*, найімовірніше, пояснюється сприятливими умовами культивування, за яких клітини перебували у метаболічно активному стані та мали доступ до поживних речовин. За таких умов дріжджі можуть інтенсивно синтезувати зв'язані полісахариди, які беруть участь у формуванні клітинної стінки,

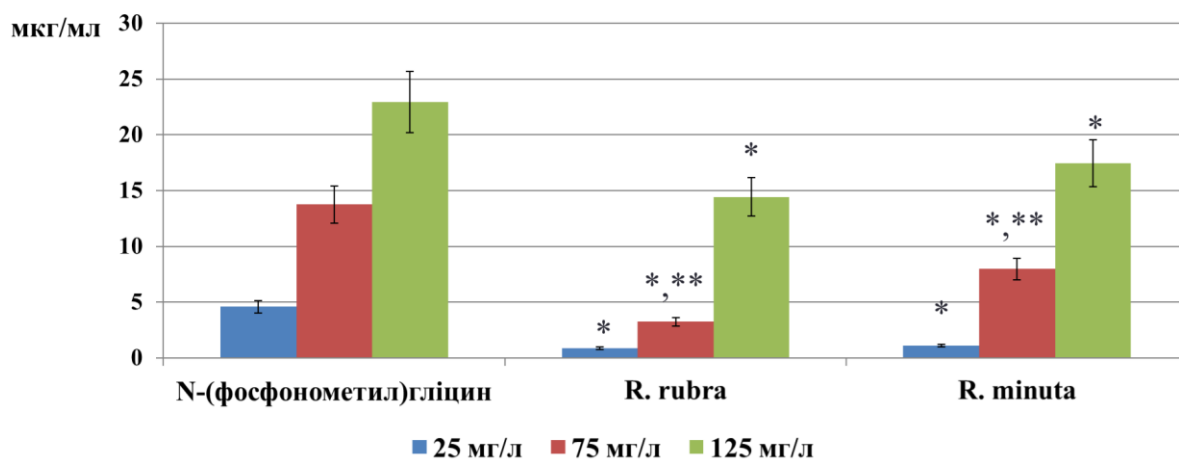
збереженні осмотичного балансу та адгезії. Природно вища здатність *R. rubra* до продукування ЕПС може бути зумовлена видовими особливостями, зокрема вищою ферментативною активністю шляхів, залучених до біосинтезу полісахаридів.

На нашу думку, зменшення вмісту ЕПС у біомасі обох видів дріжджів за дії 25 мг/л гліфосату, ймовірно, пов'язане з початковим проявом стресового впливу гербіциду, при якому частина клітинного ресурсу перенаправляється на захист або виживання, а не на синтез структурних полісахаридів.

У присутності гліфосату деякі бактерії здатні розкласти цю сполуку за допомогою ферментативних механізмів, що супроводжується вивільненням неорганічного фосфору у середовище. Основними шляхами деградації є окислювальний розпад гліфосату з утворенням АМРА та шлях СР-ліази, при якому безпосередньо розривається вуглець-фосфорний зв'язок. Саме другий механізм супроводжується утворенням неорганічного фосфору як одного з кінцевих продуктів [48].

Результати продемонстровані на рис. 3.1.4. свідчать, що *R. rubra* ефективніше засвоювала фосфор у порівнянні з *R. minuta*. Зокрема, при 25 мг/л гліфосату *R. rubra* засвоїла майже 81% доступного фосфору від теоретично можливого максимуму. При збільшенні концентрації до 75 мг/л цей показник дещо знизився – майже до 77%. Найнижча ефективність спостерігалась при 125 мг/л: було засвоєно лише 37% фосфору, що може свідчити про інгібуючий вплив високої концентрації гліфосату на клітинний метаболізм дріжджів.

У випадку *R. minuta* спостерігалися нижчі показники засвоєння фосфору на всіх рівнях досліджуваних концентрацій. За умов 25 мг/л гліфосату дріжджі засвоїли майже 77% фосфору, тоді як при 75 мг/л – лише 42%. Найменша ефективність виявлена при 125 мг/л: лише 24% фосфору було використано на потреби клітини.



**Рис. 3.1.4.** Вміст залишкового фосфору у культуральному середовищі *Rhodotorula spp.* за наявності N-(фосфонометил)гліцину після 14-денної експозиції

Загалом, обидва види дріжджів демонстрували тенденцію до зменшення засвоєння фосфору зі збільшенням концентрації гліфосату, що може бути пов'язано з токсичним ефектом або порушенням механізмів транспорту та метаболізму фосфору на клітинному рівні. Однак *R. rubra* виявилася стійкішою до зростання концентрації полютанту, зберігаючи вищу ефективність засвоєння фосфору порівняно з *R. minuta*.

Крім того, подальший метаболізм проміжних продуктів, таких як АМРА або саркозин, також може призводити до додаткового вивільнення фосфату. Таким чином, зростання концентрації неорганічного фосфору у середовищі може вказувати на активну участь мікроорганізмів у розкладанні гліфосату та є маркером мікробної трансформації цієї речовини [48].

У дослідженні, проведеному болгарськими вченими, було вивчено здатність двох штамів дріжджів до біодеградації гліфосату та карбофурану. Результати показали, що ці штами можуть ефективно використовувати гліфосат як єдине джерело фосфору, демонструючи потенціал для біоремедіації середовищ, забруднених цим гербіцидом. Зокрема, один із штамів показав здатність до повного споживання гліфосату протягом 7 днів культивування. Це свідчить про наявність у дріжджів ферментативних

систем, здатних до розщеплення гліфосату [45].

З огляду на зменшення загального вмісту фосфору у середовищі за наявності гліфосату, ми припускаємо, що дріжджі роду *Rhodotorula* здатні до часткового розкладання цієї сполуки. Незважаючи на те, що гліфосат є стійкою фосфорорганічною молекулою, результати свідчать про його поступове зменшення впродовж 14-денної експозиції, що опосередковано вказує на наявність у дріжджів ферментативних або кофермент-залежних механізмів розщеплення гліфосату з вивільненням доступного фосфору.

Ми припускаємо, що одним із ключових факторів може бути токсичний ефект гліфосату при підвищеному вмісті. Високі концентрації гліфосату могли викликати порушення клітинного метаболізму, включно з транспортом фосфору через мембрану, а також загальним зниженням метаболічної активності, що зумовило меншу ефективність його засвоєння у середовищі з 125 мг/л N-(фосфонометил)гліцину.

Нашу увагу привернуло те, що фосфор у складі гліфосату є органічно зв'язаним, і для його засвоєння клітини повинні мати відповідні ферментативні системи для розщеплення фосфорорганічних сполук. На нашу думку, *R. rubra* володіє більш ефективними механізмами катаболізму таких сполук, ніж *R. minuta*, що й зумовило вищий рівень засвоєння фосфору цим штамом.

Таким чином, отримані результати можуть бути пояснені поєднанням токсичної дії гліфосату при високих концентраціях, різницею у ферментативному потенціалі двох дріжджових видів, а також адаптаційною реакцією клітин на тривалу експозицію до фосфорорганічної сполуки.

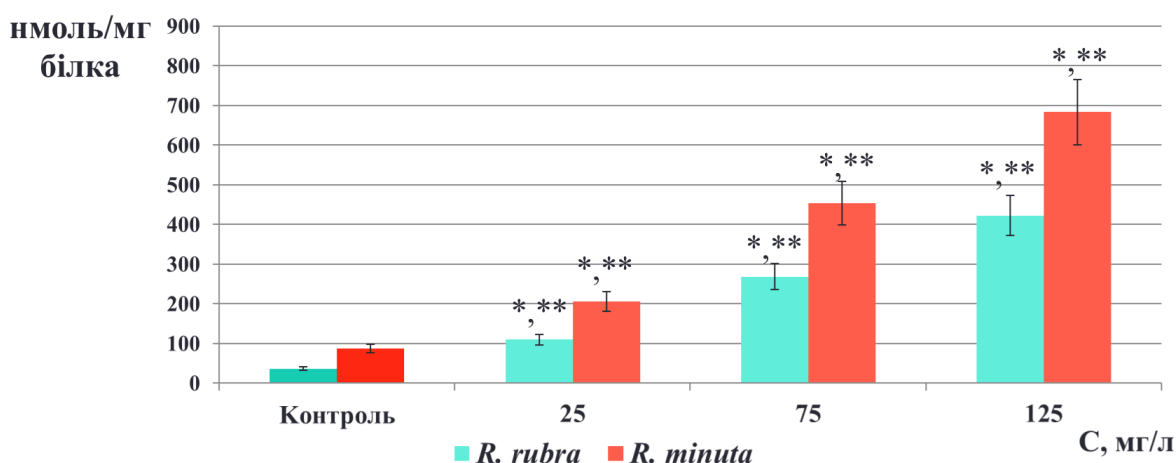
### **3.2. Оцінка рівня окремих показників про- та антиоксидантної систем**

Пероксидне окислення ліпідів – це процес, у якому вільні радикали, такі як активні форми кисню та активні форми азоту, атакують подвійні вуглець-вуглецеві зв'язки в ліпідах. Цей процес включає відщеплення водню від вуглецю та вбудовування молекули кисню. Це призводить до утворення

суміші складних продуктів, включаючи ліпідні пероксидні радикали та гідропероксиди як первинні продукти, а також малоновий диальдегід (МДА) та 4-гідроксиноненаль [49].

Після 14-денної експозиції спостерігалось дозозалежне зростання рівня тіобарбітурат-активних речовин (ТБК) у дріжджів *R. rubra* та *R. minuta*, що свідчить про розвиток оксидативного стресу та посилення процесів пероксидного окиснення ліпідів (рис. 3.2.1.).

Уже при найнижчих досліджуваних концентраціях рівень МДА, як мажорного ТБК-активного продукту для *R. rubra* зростав у 3 рази порівняно з контролем, а *R. minuta* – у 2. Підвищення вмісту гліфосату у середовищі культивування родоторул очевидно викликає глибоке пошкодження мембранних структур, що підтверджується прогресивним збільшенням вмісту ТБКАП, максимум яких фіксували при 125 мг/л пестициду.



**Рис. 3.2.1.** Вміст ТБКАП у клітинах *Rhodotorula spp.* після 14-денної дії N-(фосфонометил)гліцину

Загалом, *R. minuta* демонструє вищий рівень ТБК у всіх дослідних варіантах, що свідчить про її меншу здатність протидії оксидативному стресу порівняно з *R. rubra*, яка проявляє вищу толерантність до дії гербіциду.

Під дією гліфосату у клітинах *Rhodotorula*, очевидно, відбувається порушення редокс-балансу. Це проявляється в підвищеному утворенні активних форм кисню (ROS), що призводить до окисного стресу. У відповідь

на це активується система антиоксидантного захисту, яка включає ферменти, а також неферментативні антиоксиданти (глутатіон, трегалоза) [3, 12, 50].

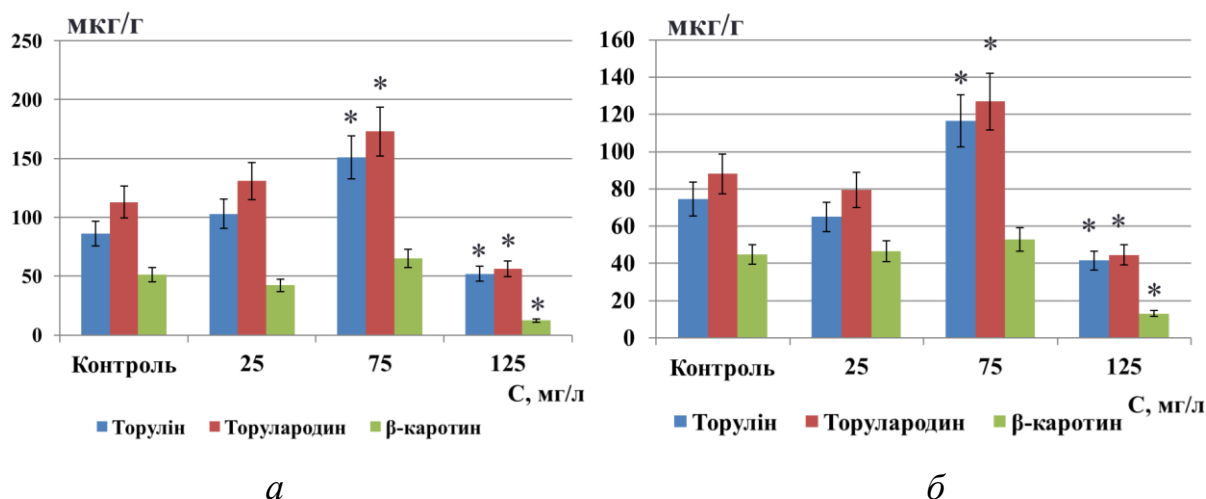
На нашу думку, гостре підвищення ТБК у варіантах з 75 і 125 мг/л може бути результатом виснаження клітинної антиоксидантної системи. У цих умовах клітина втрачає здатність нейтралізувати активні форми кисню, що сприяє накопиченню продуктів ліпопероксидації. Загалом, виявлені зміни ТБК дають підстави вважати, що основним механізмом токсичної дії гліфосату на дріжджі *Rhodotorula* є саме оксидативний стрес, із пошкодженням ліпідного шару мембран.

Вважаючи на отримані результати експериментальних спостережень, на наступному етапі нашої проводилося визначення рівня загальних та родоспецифічних каротиноїдів.

Більшість каротиноїдів складаються з восьми ізопренових ланок з 40-вуглецевим скелетом. Їх загальна структура зазвичай складається з полієнового ланцюга з дев'ятьма спряженими подвійними зв'язками та кінцевою групою на обох кінцях полієнового ланцюга [51].

Відмічено (рис. 3.2.2.), що гліфосат у концентрації 25 мг/л виявляю індіферентний вплив на  $\beta$ -каротиногенну активність обох досліджуваних мікроорганізмах.

На рис. 3.2.2.а продемонстровано, що при концентрації гліфосату 25 мг/л спостерігалось помірне підвищення продукції родоспецифічних каротиноїдів. Так, рівень торуліну зріс майже на 20%, а торулародину – майже на 16% порівняно з контролем.



**Рис. 3.2.2.** Вміст загальних та родоспецифічних каротиноїдів у клітинах *Rhodotorula spp.* за дії гліфосату після 14-денної експозиції

Найвищі показники накопичення пігментів були зафіксовані при внесенні 75 мг/л гліфосату. У цьому випадку концентрація торуліну зросла майже у 1,8 рази, торулародину – у 1,5 разів, а вміст β-каротину – приблизно на 26 % у порівнянні з контролем.

Натомість за найвищої концентрації гліфосату відзначалося суттєве зниження рівня всіх досліджених пігментів. Вміст торуліну зменшився на майже на 40%, торулародину – вдвічі, а β-каротину – більш ніж у 4 рази порівняно з контролем.

Що стосується *R. minuta*, спостерігаємо (рис. 3.2.2.б), що у контролі вміст β-каротину становив 44,8 мкг/г, при цьому торуліну — 74,6 мкг/г, а торулародину — 88,1 мкг/г. При концентрації гліфосату 25 мг/л вміст каротиноїдів дещо знизився: торулін зменшився на майже 13%, торулародин – близько на 10%, тоді як вміст β-каротину залишився практично незмінним.

Найбільш помітне зростання пігментосинтезу спостерігалось при 75 мг/л гліфосату. У цьому випадку рівень торуліну зріс майже на 56%, а торулародину – на 44% , а вміст β-каротину – приблизно на 18% порівняно з контролем.

Значне пригнічення каротиногенезу спостерігалось при концентрації гліфосату 125 мг/л. У цьому варіанті торулін зменшився майже на 44%,

торулародин – вдвічі, а вміст  $\beta$ -каротину знизився майже в 3,5 рази порівняно з контролем.

Оскільки каротиноїди відіграють роль у захисті від окисного стресу, порушення їхнього синтезу за дії гліфосату може призводити до підвищеної чутливості клітин до несприятливих умов. У попередніх дослідженнях встановлено, що вплив стресогенних чинників, зокрема оксидантів, солей та важких металів, викликає або індукцію, або пригнічення пігментоутворення залежно від інтенсивності дії [23, 52, 53, 25].

Для *R. rubra* відомо, що біосинтез торуліну та  $\beta$ -каротину тісно пов'язаний із функцією мітохондрій і потребує NADPH. У присутності гліфосату, як припускають дослідники, відбувається зміщення редокс-балансу та зменшення доступності кофакторів, що знижує синтез пігментів. В експериментах за участі *R. glutinis*, що близька до *R. rubra*, при додаванні 169,07 мг/л гліфосату в середовище концентрація пігментів зменшувалась майже вдвічі, при цьому колір колоній переходив із насичено-червоного у блідо-рожевий [23, 53, 54].

На нашу думку, такі дані є результатами активації оксидативного стресу як основного тригера біосинтезу каротиноїдів. Відомо, що каротиноїди виконують захисну роль як потужні антиоксиданти, особливо у відповідь на зовнішні токсиканти. Гліфосат, пригнічуючи ключові ферменти через механізм інгібування шикімавної кислоти, може спричинити нагромадження активних форм кисню у клітині. У відповідь на помірне стресове навантаження, клітина активує синтез каротиноїдів, щоб стабілізувати мембрани та нейтралізувати активні форми кисню. Це пояснює пікову продукцію пігментів саме на середньому рівні концентрації.

Зниження вмісту каротиноїдів на високій концентрації гліфосату можна пояснити впливом токсиканта на ферментативну активність фітоендсатурази – ключового ферменту біосинтезу кольорових каротиноїдів. Як показано в дослідженнях, деякі гербіциди (зокрема норфлуразон) не блокують активне місце ферменту для субстрату, але вступають у

конкурентну взаємодію з кофакторами, такими як НАДН або пластохінон. Це призводить до часткового пригнічення ферменту, зниження синтезу каротиноїдів та накопичення безбарвних попередників [54].

Беручи до уваги подібність каротиноїдного шляху у мікроорганізмів і рослин, ймовірно, що високі концентрації гліфосату чинять подібну дію і в дріжджів *Rhodotorula*. Це може частково пояснити різке зниження рівня каротиноїдів у досліджуваних культурах після 14 днів експозиції.

Отже, у межах роботи було досліджено коротко- та довготривалий вплив гербіциду гліфосату на фізіолого-біохімічні показники дріжджів роду *Rhodotorula spp.*, зокрема щільність клітинної суспензії, кількість колонієутворюючих одиниць (КУО), вміст неорганічного фосфору та МДА, рівень екзополісахаридів та каротиноїдів. Встановлено, що гліфосат у більшості випадків справляв інгібуючий вплив на досліджувані параметри, при цьому характер дії був дозо- та часозалежним. Результати вказують на те, що N-(фосфонометил)гліцин, у досліджуваних концентраціях, чинив гальмівний вплив на розвиток каротиногенних дріжджів лише за умов довготривалої дії, індукуючи при цьому розвиток оксидативного стресу, що супроводжувався накопиченням продуктів пероксидного окиснення ліпідів і зниженням рівня каротиноїдів.

## ВИСНОВКИ

- Внесення досліджуваних концентрацій N-(фосфонометил)гліцину у середовище культивування *Rhodotorula ssp.* не призводить до інгібування росту культур при короткотривалому вирощуванні. Довготривала дія N-(фосфонометил)гліцину у концентрації 125 мг/л гальмує розвиток даних каротиногенних дріжджів уже починаючи з 4 доби експерименту.
- *Rhodotorula minuta* відрізняється більшою чутливістю до дії поллютанта, що підтверджується зменшенням кількості життєздатних клітин, зростанням рівня ТБКАП, зниженням рівня каротиноїдів, екзополісахаридів.
- Обидва види роду *Rhodotorula* здатні ефективно метаболізувати неорганічний фосфор при нижчих з досліджуваних концентрацій N-(фосфонометил)гліцину, що опосередковано може свідчити про можливість деградації ксенобіотика ферментними системами цих мікроорганізмів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ruuskanen, S., Fuchs, B., Nissinen, R., Puigbò, P., Rainio, M., Saikkonen, K., & Helander, M. (2022). Ecosystem consequences of herbicides: the role of microbiome. *Trends in Ecology & Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.09.009>
2. Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, 616-617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
3. Cordeiro, R. d. A. (2019). *Pocket guide to mycological diagnosis*. Taylor & Francis Group.
4. Ruffolo, F., Dinhof, T., Murray, L., Zangelmi, E., Chin, J., Pallitsch, K., & Peracchi, A. (2023). The microbial degradation of natural and anthropogenic phosphonates. *Molecules*, 28(19), 6863. <https://doi.org/10.3390/molecules28196863>
5. Feng, D., Soric, A., & Boutin, O. (2020). Treatment technologies and degradation pathways of glyphosate: A critical review. *Science of the Total Environment*, 742, 140559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140559>
6. Mohy-Ud-Din, W., Bashir, S., Akhtar, M. J., Asghar, H. M. N., Ghafoor, U., Hussain, M. M., Niazi, N. K., Chen, F., & Ali, Q. (2023). Glyphosate in the environment: Interactions and fate in complex soil and water settings, and (phyto) remediation strategies. *International Journal of Phytoremediation*, 1–22. <https://doi.org/10.1080/15226514.2023.2282720>
7. Patocka, J. (2018). Is glyphosate really hazardous for human health? *Military Medical Science Letters*, 87(4), 169–183. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2018.030>
8. Herviyanti, H., Maulana, A., Lita, A. L., Prasetyo, T. B., Monikasari, M., & Ryswaldi, R. (2022). Characteristics of inceptisol ameliorated with rice husk biochar to glyphosate adsorption. *SAINS TANAH - Journal of Soil Science and*

*Agroclimatology*, 19(2), 230. <https://doi.org/10.20961/stjssa.v19i2.61614>

9. de Jesus, J. P. A., & La Porta, F. d. A. (2023). Elucidating the spectroscopic and physicochemical properties for a pH-dependent glyphosate structure from a computational perspective. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1226, 114209. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2023.114209>

10. Duke, S. O. (2020). Glyphosate: environmental fate and impact. *Weed Science*, 68(3), 201–207. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.28>

11. Freitas-Silva, L. D., Araújo, H. H., Meireles, C. S., & Silva, L. C. d. (2021). Plant exposure to glyphosate-based herbicides and how this might alter plant physiological and structural processes. *Botany*, 1–8. <https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0033>

12. Dayan, F. E., Owens, D. K., Corniani, N., Silva, F. M. L., Watson, S. B., Howell, J., & Shaner, D. L. (2015). Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. *Weed Science*, 63(SP1), 23–63. <https://doi.org/10.1614/ws-d-13-00063.1>

13. Tan, S., Evans, R., & Singh, B. (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*, 30(2), 195–204. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0254-1>

14. Altman, J. (2018). *Pesticide interactions in crop production: Beneficial and deleterious effects*. Taylor & Francis Group.

15. Kanissery, R., Gairhe, B., Kadyampakeni, D., Batuman, O., & Alferez, F. (2019). Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. *Plants*, 8(11), 499. <https://doi.org/10.3390/plants8110499>

16. Gomes, M. P., Le Manac'h, S. G., Maccario, S., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. (2016). Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 130, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.11.010>

17. Chen, Y., Chen, W.-J., Huang, Y., Li, J., Zhong, J., Zhang, W., Zou, Y., Mishra, S., Bhatt, P., & Chen, S. (2022). Insights into the microbial

degradation and resistance mechanisms of glyphosate. *Environmental Research*, 215, 114153. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114153>

18. Kourtaki, K., Buchner, D., Martin, P. R., Thompson, K., & Haderlein, S. B. (2025). Influence of organophosphonates as alternative P-sources on bacterial transformation of glyphosate. *Environmental Pollution*, 125872. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.125872>

19. Giannakara, M., & Koumandou, V. L. (2024). New insights on the glyphosate-degrading enzymes C-P lyase and glyphosate oxidoreductase based on bioinformatics. *Bacteria*, 3(4), 314–329. <https://doi.org/10.3390/bacteria3040021>

20. Carles, L., & Artigas, J. (2020). Interaction between glyphosate and dissolved phosphorus on bacterial and eukaryotic communities from river biofilms. *Science of the Total Environment*, 719, 137463. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137463>

21. Simonova, M. (2010). Carotenoids, their structure, properties and biological action. *Studia Biologica*, 4(2), 159–170. <https://doi.org/10.30970/sbi.0402.127>

22. Antunes, M., Mota, M. N., & Sá-Correia, I. (2024). Cell envelope and stress-responsive pathways underlie an evolved oleaginous *Rhodotorula toruloides* strain multi-stress tolerance. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02518-0>

23. Hashem, M., Alamri, S. A., Al-Zomyh, S. S. A. A., & Alrumman, S. A. (2018). Biodegradation and detoxification of aliphatic and aromatic hydrocarbons by new yeast strains. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 151, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.064>

24. Marcelino, G., Machate, D. J., Freitas, K. d. C., Hiane, P. A., Maldonade, I. R., Pott, A., Asato, M. A., Candido, C. J., & Guimarães, R. d. C. A. (2020).  $\beta$ -Carotene: Preventive Role for Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity: A Review. *Molecules*, 25(24), 5803. <https://doi.org/10.3390/molecules25245803>

25. Roşca, M., Silva, B., Tavares, T., & Gavrilescu, M. (2023). Biosorption of hexavalent chromium by *Bacillus megaterium* and *Rhodotorula*

*spp.* inactivated biomass. *Processes*, 11(1), 179.  
<https://doi.org/10.3390/pr11010179>

26. Liu, B., Wang, C., Liu, D., He, N., & Deng, X. (2017). Hg tolerance and biouptake of an isolated pigmentation yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *PLOS ONE*, 12(3), Стаття e0172984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172984>

27. CN114806905B - *Rhodotorula mucilaginosa* strain and application thereof - Google Patents. Google Patents.  
<https://patents.google.com/patent/CN114806905B/en>

28. Kucharska, K., Wachowska, U., & Czaplicki, S. (2020). Wheat phyllosphere yeasts degrade propiconazole. *BMC Microbiology*, 20(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12866-020-01885-6>

29. Bempelou, E. D., Vontas, J. G., Liapis, K. S., & Ziogas, V. N. (2018). Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by the epiphytic yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula rubra*. *Ecotoxicology*, 27(10), 1368–1378. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1992-7>

30. Mohammed, D., Hicham, E.A., Naima, E.G. (2023). Biodegradation of environmental pollutants by marine yeasts. *Marine Organisms: A Solution to Environmental Pollution?*, 79-91. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-17226-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-031-17226-7_5)

31. Grujić, S., Vasić, S., Radojević, I., Čomić, L., & Ostojić, A. (2017). Comparison of the *Rhodotorula mucilaginosa* biofilm and planktonic culture on heavy metal susceptibility and removal potential. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(2). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3259-y>

32. Barton, R. R., Gorfien, H., & Carlo, R. M. (1954). Determination of Bacterial Numbers on Tableware by Means of Direct Plating. *Applied Microbiology*, 2(5), 264–267. <https://doi.org/10.1128/aem.2.5.264-267.1954>

33. Процеси ліпопероксидації у клітинах *Chlorobium limicola* IMB К-8 за впливу купрум (II) сульфату / Т. Б. Сегін, С. О. Гнатуш, М. Б. Горішний // Вісник Дніпропетровського університету. Серія : Біологія. Екологія. - 2016. - Вип. 24(1). - С. 72-77. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/vdube\\_2016\\_24%281%29\\_\\_10](http://nbuv.gov.ua/UJRN/vdube_2016_24%281%29__10)

34. Waterborg, J. H., & Matthews, H. R. (1984). The lowry method for protein quantitation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1, 1–3. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:1>
35. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод /О. М. Арсан, О. А. Давидов, Т. М. Дяченко та ін.; За ред. В. Д. Рома-ненка. - НАН України. Ін-т гідробіології. - К.: ЛОГОС, 2006. - 408 с. ISBN 966-581-783-3
36. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
37. Biehler, E., Mayer, F., Hoffmann, L., Krause, E., & Bohn, T. (2010). Comparison of 3 Spectrophotometric Methods for Carotenoid Determination in Frequently Consumed Fruits and Vegetables. *Journal of Food Science*, 75(1), C55–C61. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01417.x>
38. Casida, J. E. (2017). Organophosphorus xenobiotic toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57(1), 309–327. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104926>
39. Beneath the orange fields: Impact of Glyphosate on soil organisms. (6 д.). PAN Europe. <https://www.pan-europe.info/resources/briefings/2023/11/beneath-orange-fields-impact-glyphosate-soil-organisms>
40. de Oliveira, E. P., Marchi, K. E., Emiliano, J., Salazar, S. M. C. H., Ferri, A. H., Etto, R. M., Reche, P. M., Pileggi, S. A. V., Kalks, K. H. M., Tótola, M. R., Schemczssen-Graeff, Z., & Pileggi, M. (2022). Changes in fatty acid composition as a response to glyphosate toxicity in *Pseudomonas fluorescens*. *Heliyon*, Стаття e09938. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09938>
41. Zhang, W., Chen, W.-J., Chen, S.-F., Lei, Q., Li, J., Bhatt, P., Mishra, S., & Chen, S. (2023). Cellular response and molecular mechanism of glyphosate degradation by *Chryseobacterium* sp. Y16C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07301>
42. Hertel, R., Gibhardt, J., Martienssen, M., Kuhn, R., & Commichau, F.

M. (2021). Molecular mechanisms underlying glyphosate resistance in bacteria. *Environmental Microbiology*, 23(6), 2891–2905. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15534>

43. Paul, P., Nair, R., Mahajan, S., Gupta, U., Aalhate, M., Maji, I., & Singh, P. K. (2023c). Traversing the diverse avenues of exopolysaccharides-based nanocarriers in the management of cancer. *Carbohydrate Polymers*, 120821. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120821>

44. Ahemad, M., & Malik, A. (2011b). Bioaccumulation of Heavy Metals by Zinc Resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater. *Bacteriology Journal*, 2(1), 12–21. <https://doi.org/10.3923/bj.2012.12.21>

45. Stoyanova, K., Gerginova, M., Peneva, N., Dincheva, I., & Alexieva, Z. (2023). Biodegradation and utilization of the pesticides glyphosate and carbofuran by two yeast strains. *Processes*, 11(12), 3343. <https://doi.org/10.3390/pr11123343>

46. Klátyik, S., Simon, G., Oláh, M., Takács, E., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J. G., & Székács, A. (2024). Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010 to 2023. *Environmental Sciences Europe*, 36(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-024-00849-1>

47. Tania, S., Anowara, B., & Humaira, A. (2019). Effect of pesticides on Exopolysaccharide (EPS) production, antibiotic sensitivity and phosphate solubilization by Rhizobial isolates from *Sesbania bispinosa* in Bangladesh. *African Journal of Agricultural Research*, 14(34), 1845–1854. <https://doi.org/10.5897/ajar2019.14304>

48. Souza, K. S., da Silva, M. R. F., Candido, M. A., Lins, H. T. S., de Lima Torres, G., da Silva Felix, K. C., Silva, K. C. C., Filho, R. M. N., Bhadouria, R., Tripathi, S., Singh, R., Santos, M. D. V., Silva, I. P. S., de Barros, A. V., de Araújo, L. C. A., Motteran, F., & de Oliveira, M. B. M. (2025). Biodegradation Potential of Glyphosate by Bacteria: A Systematic Review on Metabolic Mechanisms and Application Strategies. *Agronomy*, 15(5), 1247.

<https://doi.org/10.3390/agronomy15051247>

49. Aguilar Diaz De Leon, J., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (159).

<https://doi.org/10.3791/61122>

50. Kómíves, T., & Schröder, P. (2016). On glyphosate. *Ecocycles*, 2(2).  
<https://doi.org/10.19040/ecocycles.v2i2.60>

51. Ryntathiang, S., Sachu, M., & Syiem, M. B. (2024). Respponse and Tolerance of Cyanobacterial Exopolysaccharides to Rice Field Herbicide 2,4-D. *Nature Environment and Pollution Technology*, 23(2), 725–734.  
<https://doi.org/10.46488/nept.2024.v23i02.010>

52. Maoka, T. (2019). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>

53. Cheng, Z., Chi, M., Li, G., Chen, H., Sui, Y., Sun, H., Wisniewski, M., Liu, Y., & Liu, J. (2016). Heat shock improves stress tolerance and biocontrol performance of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Biological Control*, 95, 49–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.001>

54. Gong, G., Liu, L., Zhang, X., & Tan, T. (2018). Multi-omics metabolism analysis on irradiation-induced oxidative stress to *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 361–374.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9448-9>

# ДОДАТКИ

## Техніка безпеки в лабораторії біотехнологічного профілю

При проведенні робіт у біотехнологічній лабораторії потрібно ретельно дотримуватись вимог, наведених в інструкції з техніки безпеки. Якщо студент не ознайомлений з зазначеними вимогами, він повинен повідомити про це викладача.

Студент несе персональну відповідальність за власну безпеку під час виконання експериментальних робіт у лабораторії, що підтверджено його особистим підписом у журналі з техніки безпеки.

У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі. Усі студенти повинні працювати в чистих бавовняних халатах, які мають бути застебнуті на всі гудзики. Волосся необхідно прибрати з обличчя та сховати під шапочку. У лабораторії кожен працює на постійному місці та виконує завдання індивідуально. На робочому місці потрібно підтримувати зразковий порядок.

Під час виконання лабораторної роботи категорично забороняється користуватися мобільними телефонами та залишати їх увімкненими. У лабораторії забороняється вживати їжу та напої.

До роботи у біотехнологічній лабораторії не допускаються студенти, які мають пошкодження на відкритих ділянках шкіри, не оброблені та не заклеєні бактерицидним пластиром.

Працюючи з відкритим полум'ям (газовий пальник, спиртівка), потрібно дотримуватися таких вимог: запалювати спиртівку та газовий пальник лише за допомогою сірника, гасити запалену спиртівку потрібно, закривши доступ

повітря спеціальним ковпачком, а газовий пальник – перекриттям доступу газу. Розташовувати спиртівку потрібно на відстані не менш, ніж 20 см від краю робочого стола. У разі випадкового займання ватно-марлевого корка необхідно терміново загасити його, заклавши доступ повітря.

Під час роботи з живими культурами мікроорганізмів необхідно слідкувати за наявністю запобіжних ватних тампонів у піпетках та ватномарлевих корків у пробірках. У випадку потрапляння мікробного матеріалу на відкриті ділянки шкіри, стіл чи підлогу це місце треба ретельно обробити дезінфікуювальним розчином та ретельно промити водою.

Роботу у мікробіологічному боксі дозволено проводити лише за проходження додаткового інструктажу з техніки безпеки, наявності відповідного захисного одягу (халат, шапочка, захисна маска та захисні окуляри).

Категорично забороняється заходити у бокс за увімкненої бактерицидної лампи.

Всі предмети, використані у роботі з живими мікроорганізмами, мають бути знезаражені фламбуванням (петлі, голки), кип'ятінням (пробірки, чашки Петрі), обробленням дезінфікуювальними розчинами (шпателі, піпетки, предметні й накривні скельця). Забороняється користуватися скляним посудом, що має сколи, тріщини, гострі краї.

У лабораторії необхідно дотримуватися обережності під час роботи з хімічними речовинами. При потребі (робота з концентрованими хімічними речовинами) потрібно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, респіратори, гумовий фартух, захисні окуляри). У процесі розведення концентрованої кислоти необхідно кислоту вносити у розчинник, а не навпаки. У випадку потрапляння будь-яких хімічних речовин на шкіру необхідно змити реактив великою кількістю води; нейтралізувати кислоту

необхідно слабким розчином соди, а луг – слабким розчином оцтової кислоти.

Роботу з концентрованими та леткими хімічними речовинами необхідно проводити під витяжною шафою.

Необхідно суворо дотримуватися вимог електробезпеки. Забороняється користуватися несправним електрообладнання і вмикати прилади без дозволу викладача або лаборанта, а також торкатися поверхні приладу мокрими руками.

Після закінчення роботи студент повинен упорядкувати робоче місце, руки необхідно ретельно вимити, а за потреби обробити дезінфікувальним розчином. Слід мати індивідуальний рушник або серветки для витирання рук.

**Публікації за результатами дослідження**